

Daniel Cuzziol Cruz

**Germinação de sementes de *Passiflora tenuifila* Killip e
Passiflora setacea DC. e cultura *in vitro* de
Passiflora tenuifila (Passifloraceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para aprovação na disciplina BIO 7016 – Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Viana

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cruz, Daniel Cuzziol
Germinação de sementes de *Passiflora tenuifila* Killip e
Passiflora setacea DC. e cultura in vitro de *Passiflora*
tenuifila (Passifloraceae) / Daniel Cuzziol Cruz ;
orientadora, Ana Maria Viana - Florianópolis, SC, 2016.
110 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Germinação. 3. Conservação de
sementes. 4. *Passiflora tenuifila*. 5. *Passiflora setacea*.
I. Viana, Ana Maria. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Daniel Cuzziol Cruz

Germinação de sementes de *Passiflora tenuifila* Killip e *Passiflora setacea* DC. e cultura *in vitro* de *Passiflora tenuifila* (Passifloraceae)

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas, e aprovado em sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 15 de julho de 2016.

Prof^ª. Maria Risoleta Freire Marques, Dr^ª.
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof^ª. Ana Maria Viana, Dr^ª.
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina (BOT - CCB)

Prof. João de Deus Medeiros, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina (BOT - CCB)

Eduardo da Costa Nunes, Dr.
EPAGRI (SC)

*Ao Miguel,
minha maior conquista,
meu presente divino,
fonte de inspiração,
alegria de vida.
Amo-te incondicionalmente!*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela dedicação na criação e pelo incentivo e liberdade que me permitiram realizar o que mais gosto: estudar a natureza!

À minha família, por todo amor e carinho vividos em todos esses anos. O sentimento é mútuo.

À orientadora Ana Viana, pelos conhecimentos adquiridos e pelos momentos compartilhados no laboratório.

Aos professores que se empenham na educação de seus discípulos, pela criação de um planeta sustentável, no Brasil e pelo mundo afora.

Aos mestres que me serviram de inspiração: pelo conhecimento; pela atenção para com os estudantes e com suas disciplinas; e pelo modo como lecionavam, não só a alunos, mas sim, a pessoas. Entre tantos outros esquecidos, obrigado Carol Kolyniak, Evelise Nazari, Luana von Linsingen, Patrícia Giraldi, Ronaldo Negrão, Sergio de Moraes e Vilma Palazetti!

Aos professores e funcionários do Departamento de Botânica, em especial Daniel Falkenberg, Elisandro Ricardo, João Medeiros, Mayara Caddah e Pedro Fiaschi, pelo comprometimento para com a docência e com os discentes.

Aos amigos e colegas pela parceria.

À Camila, companheira nos momentos felizes, fáceis, simples (e nos outros também!). Um fim de mar que colore meu horizonte. “A voz de um passarinho me recita”.

À Mãe Natureza e a essa Energia que nos rege, por tremenda beleza e singularidade. Em tão vasto universo, fomos presenteados. Agradeço à vida!

RESUMO

Estudos preliminares vêm mostrando o potencial de espécies silvestres de maracujás (*Passiflora* spp.) como resistentes a moléstias do solo, podendo ser utilizadas em programas de melhoramento genéticos como doadoras de genes de resistência, para hibridização ou como porta-enxertos para espécies comerciais, ou ainda serem cultivadas em larga escala para comercialização de seus frutos no mercado. Seus benefícios medicinais, sobretudo como sonífero e ansiolítico, têm sido explorados há séculos. Mas, para que a utilização destas espécies possa ser efetiva, é necessário estudar sua biologia. Sob esse aspecto, o trabalho teve como objetivo aumentar o conhecimento acerca da germinação e testar metodologias para a conservação de sementes de *Passiflora tenuifila* e *P. setacea*. Os resultados mostraram: a eficiência do ácido giberélico para interromper a dormência das sementes, resultando em altos níveis de germinação; a eficiência de armazenar as sementes nos frutos intactos ao ar livre e armazenadas *in vitro* envolvidas pelo endocarpo mantidos a 5°C; a capacidade das sementes em suportar a criopreservação (-196°C), e; a glicose como o açúcar que melhor promoveu o desenvolvimento das microplantas propagadas *in vitro*.

Palavras-chave: Germinação. Conservação de sementes. *Passiflora tenuifila*. *Passiflora setacea*.

ABSTRACT

The potential of wild passion flowers (*Passiflora* spp.) species has been shown on preliminaries studies, which include resistance to soil diseases, supporting gene donation in genetic engineering programs, hybridization and the use as rootstock for commercial species, or even been large scale cultivated for its fruit commercialization. Its medicinal use has long been known, especially to treat insomnia and anxiety. However, for the effective use of these wild species, it is essential the study of its biology. In this sense, the present work aimed to increase the knowledge of germination and to test different methods in seeds conservation of *Passiflora tenuifila* and *P. setacea*. Results have showed: gibberelic acid efficiency to break seed dormancy, resulting on high levels of germination; storage efficacy of whole fruits bearing seeds at room condition, and *in vitro* storage of seeds surrounded by the endocarp and maintained at 5°C; seed ability to tolerate cryopreservation (-196°C), and; glucose as the best development promoter of *in vitro* microplants.

Keywords: Germination. Seed conservation. *Passiflora tenuifila*. *Passiflora setacea*.

RESUMEN

Estudios preliminares han demostrado el potencial de las especies silvestres de maracuyá (*Passiflora* spp.) como resistentes a enfermedades del suelo, pudiendo ser utilizados en programas de mejoramiento genético como donantes de genes de resistencia, para hibridación, como portainjerto para las especies comerciales, o para cultivarse a gran escala para la comercialización de sus frutos en el mercado. Sus propiedades medicinales, especialmente conciliando el sueño y como ansiolítico, son conocidos por siglos. Sin embargo, para que el uso de estas especies pueda ser eficaz, es necesario estudiar su biología. En este sentido, este trabajo tuvo como objetivo aumentar el conocimiento sobre los métodos de germinación y de probar metodologías de conservación de semillas de *Passiflora tenuifila* y *P. setacea*. Los resultados mostraron: la eficiencia de ácido giberélico para romper la dormancia de la semilla, resultando en altos niveles de germinación; la eficiencia de almacenamiento de las semillas en los frutos intactos en temperatura ambiente y semillas almacenadas *in vitro* envueltas en el endocarpio a 5°C; la capacidad de las semillas de resistir la criopreservación (-196°C), y; glucosa como el azúcar que mejor promovió el desarrollo de microplantas propagadas *in vitro*.

Palabras clave: Germinación. Conservación de semillas. *Passiflora tenuifila*. *Passiflora setacea*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do armazenamento a 5°C de frutos e sementes em sacos plásticos sobre o teor de água das sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> e de <i>Passiflora setacea</i> não armazenadas ou após 30, 80 e 130 dias de armazenamento.....	42
Tabela 2. Efeito do armazenamento a 5°C de frutos e sementes de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i> sobre a germinação (%). Dados aos 84 dias do início do experimento.....	45
Tabela 3. Coeficientes de correlação simples (r) entre os teores de água e taxas de germinação das sementes de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i> não armazenadas ou armazenadas por 30, 80 e 130 dias a 5°C.....	51
Tabela 4. Teor de água de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> removidas dos frutos maduros imediatamente após a coleta.....	52
Tabela 5. Efeito do ácido giberélico e do tempo de embebição sobre a germinação de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> aos 77 dias (1 dia de embebição) e 73 dias (5 dias de embebição) a partir do início do experimento.	53
Tabela 6. Efeito da 6-benzilaminopurina e do tempo de embebição sobre a germinação de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> aos 112 dias (1 dia de embebição) e 105 dias (5 dias de embebição) a partir do início do experimento.....	54
Tabela 7. Efeito de ácido giberélico e de 6-benzilaminopurina e do tempo de embebição sobre a germinação de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> aos 112 dias (1 dia de embebição) e 105 dias (5 dias de embebição) a partir do início do experimento.....	55
Tabela 8. Teor de água perdida pelos frutos de <i>P. tenuifila</i> no decorrer de 10 semanas de armazenamento ao ar livre, a 25°C e UR de 70%....	62
Tabela 9. Efeito do armazenamento dos frutos de <i>Passiflora tenuifila</i> ao ar livre a 25°C sobre o teor de água das sementes.....	63
Tabela 10. Efeito do armazenamento dos frutos de <i>Passiflora tenuifila</i> ao ar livre a 25°C sobre a germinação (%).	64

Tabela 11. Teor de água perdida pelos frutos de *P. tenuifila* no decorrer de 20 semanas de armazenamento ao ar livre, a 25°C e UR de 70% 66

Tabela 12. Efeito do armazenamento dos frutos de *Passiflora tenuifila* ao ar livre a 25°C sobre o teor de água das sementes..... 68

Tabela 13. Efeito do armazenamento dos frutos de *Passiflora tenuifila* ao ar livre a 25°C sobre a germinação (%) 68

Tabela 14. Efeito do armazenamento dos frutos de *Passiflora tenuifila* ao ar livre a 25°C sobre a germinação (%). Dados aos 65 dias do início do experimento..... 70

Tabela 15. Teor de água de sementes de *Passiflora tenuifila* removidas dos frutos maduros após 12 meses de armazenamento ao ar livre em temperatura ambiente..... 72

Tabela 16. Efeito do tempo de desinfecção em água sanitária comercial (2,5% de cloro ativo) sobre a germinação *in vitro* de sementes de *Passiflora tenuifila*..... 74

Tabela 17. Efeito da temperatura e do período de armazenamento *in vitro* de sementes de *Passiflora tenuifila* envolvidas pelo endocarpo obre o teor de água das sementes.....76

Tabela 18. Efeito da temperatura e do período de armazenamento *in vitro* das sementes de *Passiflora tenuifila*, envolvidas pelo endocarpo, na germinação aos 35 dias do início do experimento..... 77

Tabela 19. Efeito de sacarose e glicose na morfogênese *in vitro* de microplantas de *Passiflora tenuifila* cultivadas por 3 meses em meio de cultura MS, suplementado com 88,5 mM de sacarose ou glicose e 0,2% de PhytageI™..... 82

Tabela 20. Efeito de sacarose e glicose no crescimento *in vitro* de microplantas de *Passiflora tenuifila* cultivadas por 3 meses em meio de cultura MS suplementado com 88,5 mM de sacarose ou glicose e 0,2% de PhytageI™..... 83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variação do teor de água de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> com o decorrer do período de armazenamento a 5°C, nos frutos e em sacos plásticos.....	43
Figura 2. Variação do teor de água de sementes de <i>Passiflora setacea</i> com o decorrer do período de armazenamento a 5°C, nos frutos e em sacos plásticos.....	43
Figura 3. Variação no teor de água de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> removidas dos frutos frescos (tempo zero) ou mantidas nos frutos a 5°C por períodos de 1, 2, 5 e 6 meses.	44
Figura 4. Relação entre taxa de germinação de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> e período de armazenamento a 5°C, nos frutos e em sacos plásticos.....	46
Figura 5. Relação entre taxa de germinação de sementes de <i>Passiflora setacea</i> e período de armazenamento a 5°C, nos frutos e em sacos plásticos	47
Figura 6. Germinação de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> (Pt) e <i>Passiflora setacea</i> (Ps) submetidas a 30 dias de armazenamento a 5°C em sacos plásticos (sem) ou nos frutos (fru).....	48
Figura 7. Germinação de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> (Pt) e <i>Passiflora setacea</i> (Ps) submetidas a 80 dias de armazenamento a 5°C em sacos plásticos (sem) ou nos frutos (fru).....	50
Figura 8. Germinação de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> (Pt) e <i>Passiflora setacea</i> (Ps) submetidas a 130 dias de armazenamento a 5°C em sacos plásticos (sem) ou nos frutos (fru).....	50
Figura 9. Relação entre taxa de germinação de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> e concentrações de GA utilizadas na embebição por 1 dia e 5 dias.....	54
Figura 10. Relação entre taxa de germinação de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> e concentrações de BAP utilizadas na embebição por 1 dia e 5 dias.....	56
Figura 11. Relação entre taxa de germinação de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> e concentrações de BAP+GA utilizadas na embebição por 1 dia e 5 dias.....	56

Figura 12. Germinação em função do tempo de sementes de *P. tenuifila* não embebidas ou previamente embebidas por 1 e 5 dias em água ou soluções de ácido giberélico (GA) de 0,31%, 0,62%, 1,25% e 2,5%.....57

Figura 13. Germinação em função do tempo de sementes de *P. tenuifila* não embebidas ou previamente embebidas por 1 e 5 dias em água ou soluções de 6-benzilaminopurina (BAP) de 0,31%, 0,62%, 1,25% e 2,5% 58

Figura 14. Germinação em função do tempo de sementes de *P. tenuifila* não embebidas ou previamente embebidas por 1 e 5 dias em água ou soluções de 6-benzilaminopurina (BAP) de 0,31%, 0,62%, 1,25% em combinação com soluções de mesmas concentrações de GA..... 59

Figura 15. Efeito do tempo de desidratação ao ar livre a 25°C sobre a redução nas massas frescas (g) dos frutos (30 frutos) de *P. tenuifila* analisados individualmente durante o decorrer do período de armazenamento. 62

Figura 16. Efeito do tempo de desidratação ao ar livre a 25°C sobre o teor de água (%) perdida pelos frutos (30 frutos) de *P. tenuifila* analisados individualmente durante o decorrer do período de armazenamento..... 63

Figura 17. Germinação em função do tempo de sementes de frutos de *P. tenuifila* não armazenados (tempo zero no início do experimento, t0) ou submetidos por 45 dias (45d), 7 meses (7m) e 10 meses (10m) de armazenamento ar livre, a 25°C..... 65

Figura 18. Efeito do tempo de desidratação ao ar livre a 25°C sobre a redução nas massas frescas (g) dos frutos (32 frutos) de *P. tenuifila* analisados individualmente durante o decorrer do período de armazenamento. 66

Figura 19. Efeito do tempo de desidratação ao ar livre, a 25°C sobre o teor de água (%) perdida pelos frutos (32 frutos) de *P. tenuifila* analisados individualmente durante o decorrer do período de armazenamento..... 67

Figura 20. Germinação em função do tempo de sementes de frutos de *P. tenuifila* não armazenados (tempo zero no início do experimento, t0) ou submetidos por 8 meses (8m), 9,5 meses (9,5m), 12 meses (12m) e 13,5 meses (13,5m) de armazenamento ao ar livre, a 25°C..... 69

Figura 21. Germinação em função do tempo de sementes de frutos de <i>P. tenuifila</i> não armazenados (tempo zero no início do experimento, t0) ou submetidos por 9 meses (9m), 10 meses (10m), 12 meses (12m) e 13,5 meses (13,5m) de armazenamento ao ar livre, a 25°C.....	71
Figura 22. Germinação de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> submetidas ou não à criopreservação por 1 hora em nitrogênio líquido.....	73
Figura 23. Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> submetidas à desinfecção por 10, 20 e 30 minutos em solução comercial de hipoclorito de sódio.....	75
Figura 24. Variação do teor de água de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> com o decorrer do período de armazenamento <i>in vitro</i> dos endocarpos a 5°C e 25°C, por 0, 4, 8 e 17 semanas.....	77
Figura 25. Germinação de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> armazenadas nos endocarpos mantidos <i>in vitro</i> em temperaturas de 25°C e de 5°C, por 4 meses, e embebidas, por 5 dias em solução aquosa de 2,5% de GA ou água, antes de serem colocadas para germinar.....	79
Figura 26. Germinação de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> armazenadas nos endocarpos mantidos <i>in vitro</i> em temperatura de 5°C, por 4, 8, 17 e 18 meses, e embebidas, por 5 dias em solução aquosa de 2,5% de GA, antes de serem colocadas para germinar.....	80
Figura 27. Germinação de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> armazenadas a 5°C, em frutos em sacos plásticos e em sacos plásticos; a 25°C, em frutos, ao ar livre; a 5°C e 25°C envolvidas pelo endocarpo e mantidas <i>in vitro</i>	81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. AS ESPÉCIES.....	23
1.2. QUALIDADES DAS ESPÉCIES DE MARACUJÁS	24
1.2.1. Características nutricionais.....	24
1.2.2. Propriedades farmacológicas.....	25
1.2.3. Utilização ornamental.....	25
1.3. CULTIVO DE MARACUJÁS	26
1.3.1. Benefícios agrícolas das passifloras silvestres	26
1.3.2. Dificuldades no cultivo.....	27
1.4. O PROJETO DA EMBRAPA CERRADOS	27
1.5. FISIOLOGIA DAS SEMENTES	28
1.5.1. Germinação.....	29
1.5.2. Dormência.....	30
1.5.3. Fitormônios.....	30
1.5.4. O balanço ABA/GA	32
1.6. ESTUDOS SOBRE GERMINAÇÃO, DORMÊNCIA E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE <i>PASSIFLORA</i> SPP.	34
1.6.1. Germinação de sementes de <i>Passiflora</i> spp.	34
1.6.2. Armazenamento e conservação de sementes de <i>Passiflora</i> spp.	35
2. OBJETIVOS	36
2.1. OBJETIVO GERAL	36
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	37
3.2. GERMINAÇÃO E ARMAZENAMENTO <i>EX VITRO</i> DAS SEMENTES DE <i>P. TENUIFILA</i> E <i>P. SETACEA</i>	37

3.2.1. Efeito do armazenamento em geladeira (5°C) de frutos e sementes em sacos plásticos na germinação das sementes de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i>	37
3.2.2. Efeito de ácido giberélico e 6-benzilaminopurina na germinação das sementes de <i>P. tenuifila</i>	37
3.2.3. Efeito do armazenamento dos frutos ao ar livre a 25°C na germinação das sementes de <i>P. tenuifila</i>	38
3.2.4. Efeito da criopreservação na germinação das sementes de <i>P. tenuifila</i>	38
3.3. GERMINAÇÃO E ARMAZENAMENTO <i>IN VITRO</i> DAS SEMENTES DE <i>P. TENUIFILA</i>	39
3.3.1. Germinação <i>in vitro</i> das sementes.....	39
3.3.2. Efeito do armazenamento das sementes de <i>P. tenuifila</i> envolvidas pelo endocarpo e mantidas <i>in vitro</i> na germinação.....	39
3.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA DAS SEMENTES	40
3.5. EFEITO DE FONTES DE CARBONO NO CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> DAS MICROPLANTAS DE <i>P. TENUIFILA</i>	40
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
 4. RESULTADOS	 41
4.1. GERMINAÇÃO E CONSERVAÇÃO <i>EX VITRO</i> DE SEMENTES DE <i>P. TENUIFILA</i> E <i>P. SETACEA</i>	41
4.1.1. Efeito do armazenamento em geladeira (5°C) de frutos e sementes em sacos plásticos na germinação de sementes de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i>	41
4.1.2. Efeito de ácido giberélico e 6-benzilaminopurina na germinação das sementes de <i>P. tenuifila</i>	51
4.1.3. Efeito do armazenamento dos frutos ao ar livre a 25°C na germinação das sementes de <i>P. tenuifila</i>	61
4.1.4. Efeito da criopreservação na germinação de sementes de <i>P. tenuifila</i>	72
4.2. GERMINAÇÃO E CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEMENTES DE <i>P. TENUIFILA</i>	73

4.2.1. Germinação <i>in vitro</i> de sementes.....	73
4.2.2. Efeito do armazenamento das sementes de <i>P. tenuifila</i> , envolvidas pelo endocarpo e mantidas <i>in vitro</i> a 5°C e 25°C, na germinação	76
4.3. CULTURA <i>IN VITRO</i> DE <i>P. TENUIFILA</i>	82
 5. DISCUSSÃO	84
5.1. EFEITO DO ARMAZENAMENTO EM GELADEIRA (5°C) DE FRUTOS E SEMENTES EM SACOS PLÁSTICOS NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>P. TENUIFILA</i> E <i>P. SETACEA</i>	84
5.2. EFEITO DE ÁCIDO GIBERÉLICO E 6-BENZILAMINOPURINA NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>P. TENUIFILA</i>	88
5.3. EFEITO DO ARMAZENAMENTO DOS FRUTOS AO AR LIVRE A 25°C NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>P. TENUIFILA</i>	91
5.4. EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>P. TENUIFILA</i>	92
5.5. EFEITO DO ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES DE <i>P. TENUIFILA</i> , ENVOLVIDAS PELO ENDOCARPO E MANTIDAS <i>IN VITRO</i> A 5°C E 25°C, NA GERMINAÇÃO	93
5.6. CULTURA <i>IN VITRO</i> DE <i>P. TENUIFILA</i>	95
 6. CONCLUSÕES	97
 REFERÊNCIAS.....	98
APÊNDICE - FOTOGRAFIAS	108

1. INTRODUÇÃO

1.1. AS ESPÉCIES

A família Passifloraceae Juss. ex Roussel compreende entre 530-750 espécies descritas, dependendo do autor (BERNACCI, 2003; BERNACCI *et al.* 2005; FEUILLET; MACDOUGAL, 2007), distribuídas em cerca de 20 gêneros, as quais se encontram, em sua grande maioria, em ambiente pantropical, principalmente nas Américas e na África. Espécies de clima temperado podem ser encontradas ao norte e ao sul das Américas, no sul da China e na Nova Zelândia (FEUILLET; MACDOUGAL, 2007).

Seu gênero mais rico é *Passiflora* L. com 400-500 espécies, das quais 90% encontram-se nos trópicos e subtropicais (ZERAÍK *et al.*, 2010), e apenas cerca de 25 podem ser encontradas fora das Américas (FEUILLET; MACDOUGAL, 2007). O Brasil apresenta uma grande variedade de espécies do gênero, cerca de 140 espécies descritas, de acordo com o site do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (BERNACCI *et al.*, 2016), sendo um dos países mais ricos em sua diversidade. Este fato, também, caracteriza o Brasil, mais especificamente, o centro-norte brasileiro, como um expressivo centro de diversidade do gênero, com muitas espécies silvestres (FALEIRO *et al.*, 2011).

O nome dado ao gênero (e à família) (do latim *passio* = paixão e *flos* = flor) foi originado quando colonizadores europeus chegaram à América, e se deslumbraram com suas flores, conforme relato de Cervi (1997, p. 4):

“O nome de flor da paixão se deve (...) pelo que representavam, para os seus conhecedores, homens de fé católica, partes da flor e folhas em relação a alguns instrumentos da paixão de Cristo. Assim, as folhas recordavam a lança que transpassou o Salvador na cruz; as gavinhas, o açoite; a corona de filamentos (...) a coroa de espinhos; os três estiletes simulavam os três cravos e as cinco anteras representavam as chagas do crucificado”.

Trepadeiras herbáceas ou lenhosas com gavinhas, suas flores são vistosas e coloridas. A corona apresenta filamentos seriados em uma ou mais fileiras acima das pétalas. As sementes, numerosas, são envoltas por um arilo polposo. (KILLIP, 1938; CERVI, 1997; FEUILLET; MACDOUGAL, 2007).

Os frutos das espécies deste gênero são ricos em sais minerais e vitaminas e as espécies são reconhecidas pelas propriedades farmacológicas, nutricionais e ornamentais (ZUCARELI *et al.*, 2009b). Cunha, Barbosa e Junqueira (2002 *apud* FALEIRO *et al.*, 2011) contabilizaram 70 espécies do gênero com fruto comestível, porém, Costa e Tupinambá (2005) alertam para o fato de que, apesar de todas espécies produzirem frutos, nem todos são comestíveis, podendo, em alguns casos, apresentar certa toxicidade.

Os ambientes florestais contínuos vêm sofrendo reduções em suas áreas, levando-os à fragmentação. Para Ferreira (2005), a erosão genética que as espécies de maracujá vêm sofrendo, é significativa, e causada, principalmente, pela interferência humana na redução dos ambientes naturais, seja pelo aumento das áreas de agropecuária, ou pelo crescimento industrial (poluição, rodovias, hidrelétricas). Para Faleiro *et al.* (2011, p. 17) é primordial a “criação, ampliação e manutenção” de bancos de germoplasma, a fim de prevenir a extinção e conservar genótipos que poderiam ser utilizados em estudos de melhoramento genético, tendo em vista a perda de áreas naturais.

Passiflora tenuifila Killip pode ser encontrada no Sul e Sudeste brasileiro, entre os estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul na floresta pluvial tropical atlântica e em áreas de transição com o cerrado ‘*lato sensu*’, enquanto *P. setacea* DC. é endêmica do centro-leste brasileiro, podendo ser encontrada nos estados do Mato Grosso até a Bahia, e da Bahia até o Rio de Janeiro, na caatinga e cerrado, podendo ser também encontrada nas áreas de transição com floresta pluvial atlântica (BERNACCI *et al.*, 2016).

São espécies silvestres cuja capacidade de resistência a doenças do solo, apresentada em estudos preliminares (ver, p.ex., JUNQUEIRA *et al.*, 2005; FALEIRO *et al.*, 2008), favorece sua utilização como fonte de genes de resistência em programas de melhoramento genético, ou mesmo como porta-enxertos. O plantio e colheita dos seus frutos para consumo *in natura* é recomendável em locais onde as espécies domesticadas crescem com dificuldades, seja devido às condições climáticas ou pelas moléstias do solo.

1.2. QUALIDADES DAS ESPÉCIES DE MARACUJÁS

1.2.1. Características nutricionais

Frutos são reconhecidos pelo conteúdo de vitaminas e minerais e, no maracujá, evidenciam-se as vitaminas A e C (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005) e os minerais cálcio, ferro, fósforo, magnésio e zinco (CAMPOS, 2010; TUPINAMBÁ, 2012). Zeraik *et al.* (2010)

enaltecem a presença de fibras (principalmente na casca dos frutos) e ácidos graxos poliinsaturados (sementes), apontando para a possibilidade das espécies terem uma ação funcional no organismo.

O consumo de seu fruto se dá, em grande parte, *in natura* (no seu estado natural) ou através do suco de sua polpa. Sua utilização ocorre, em menor escala, como doces, sorvetes e geléias, assim como pelas indústrias farmacêuticas e cosméticas (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005).

1.2.2. Propriedades farmacológicas

Folhas, flores, frutos e raízes de maracujá têm sido utilizados como medicinal, não só por culturas americanas, onde abunda, mas também, por culturas européias e asiáticas (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005). Ainda segundo as autoras, sua utilização popular é indicada para uma ampla gama de distúrbios, porém, sua ação mais difundida, se dá sobre o sistema nervoso, como antidepressivo, sonífero e no combate à ansiedade. Dhawan, Dhawan e Sharma (2004) ainda destacam o uso popular como diurético, sedativo, analgésico, vermífugo, antitumoral entre outros.

Costa e Tupinambá (2005) salientam que o conhecimento científico acerca do uso medicinal das *Passiflora* spp. ainda é pequeno, porém Ozarowski e Thiem (2013) relacionam um crescente número de estudos no tema.

Entre os compostos bioativos, destacam-se os flavonóides, saponinas, fenóis, alcalóides e esteróis, os quais são encontrados em diferentes proporções em cada parte da planta (folha, fruto, semente), diferindo também de espécie para espécie (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; COSTA; TUPINAMBÁ, 2005; ZUCOLOTTI *et al.*, 2012; OZAROWSKI; THIEM, 2013).

1.2.3. Utilização ornamental

Algumas espécies são cultivadas e devido à beleza de suas flores, as quais são coloridas, vistosas, aromáticas e, dependendo da espécie, podem florescer ao longo de todo o ano. Espécies silvestres são usadas, mas desde o século XVII já se tem conhecimento da utilização de híbridos com esse fim. A inflorescência com muitas flores e a extravagante variedade de morfologias foliares agregam valor à utilização ornamental (ABREU *et al.*, 2008).

Peixoto (2005) discorre sobre seus usos mais comuns na ornamentação, os quais incluem a utilização em cercas vivas e pergolados, na cobertura de áreas tanto ao sol quanto à sombra. Também há espécies para locais à meia-sombra. O autor ainda indica a possibilidade para usá-las em vasos, desde que sejam adequados.

Faleiro *et al.* (2008) relatam o trabalho da Embrapa com híbridos entre *P. coccínea* x *P. setacea*, no qual foi possível o lançamento do híbrido ornamental com o nome de BRS Estrela do Cerrado. Os trabalhos seguintes, com os retrocruzamentos destas espécies, resultaram no lançamento de mais dois híbridos.

1.3. CULTIVO DE MARACUJÁS

O Brasil é, de longe, o maior produtor de maracujás, produzindo cerca de 800 mil toneladas (t) por ano (823 mil t em 2014) (IBGE, 2014), seguido por países como Equador, Colômbia, Peru, África do Sul e Austrália (FALEIRO *et al.*, 2011). Os Estados com a maior produtividade nacional são Bahia e Ceará, com 381 e 144 mil t anual, respectivamente, colhidos em uma área de 30 e 6,5 mil hectares, respectivamente (IBGE, 2014). *P. edulis* (maracujá-azedo) e *P. alata* (maracujá-doce) representam, praticamente, a totalidade da produtividade nacional no mercado frutífero, enquanto as outras espécies atingem o comércio apenas em escala local, algumas vezes sem seu cultivo, sendo seus frutos colhidos diretamente da natureza ou apenas para o consumo doméstico (BERNACCI *et al.*, 2005).

1.3.1. Benefícios agrícolas das passifloras silvestres

Os estudos científicos estão centrados nas espécies comercializadas e pouco se conhece sobre a biologia das espécies silvestres, as quais são conhecidas por apresentarem resistência a doenças e que podem ser utilizadas como doadoras de genes ou porta-enxertos (MELETTI *et al.*, 2005; FALEIRO *et al.*, 2008). Algumas espécies silvestres também são conhecidas por apresentarem resistência a nematóides (FALEIRO *et al.*, 2012). Segundo Braga *et al.* (2006), uma solução para locais onde o cultivo é inviável por causa das moléstias do solo, seria a enxertia com espécies resistentes. Faleiro *et al.* (2008) acrescenta a hibridização entre espécies resistentes e comerciais como outro mecanismo para aumentar e melhorar a produção.

Na região central do Brasil, espécies como *P. setacea* e *P. coccínea*, conforme relato de Faleiro *et al.* (2008), se comportam de maneira oposta à comercial *P. edulis*, ao florescerem no período de dia curto e, portanto, suas colheitas ocorrem durante o período de entressafra de *P. edulis*, o que poderia suprir um fornecimento ininterrupto de frutas durante o ano.

1.3.2. Dificuldades no cultivo

No Brasil, os cultivos comerciais de maracujazeiros são feitos, principalmente, através de sementes, cujo resultado é indivíduos morfológicamente desuniformes, devido à alta heterozigose, o que leva também, a frutos desiguais e respostas diferentes de cada indivíduo às condições climáticas e ecológicas. Sob esse aspecto, a propagação vegetativa seria vantajosa, pois traria um pomar uniforme com plantas resistentes a pragas e doenças (NOGUEIRA FILHO *et al.*, 2011).

Outro ponto que deve ser considerado são as doenças e pragas. Uma das doenças que mais acometem as espécies comerciais é a morte prematura, ainda com causa desconhecida, entretanto, está associada a outras enfermidades que acometem os pomares de maracujá, entre eles, os fungos como *Fusarium* spp. e *Phytophthora* spp. e bactérias como *Xanthomonas axonopodis* f. *passiflorae* (RONCATTO *et al.*, 2004). A virose do endurecimento do fruto (PWV) é uma das mais prejudiciais para o cultivo de *P. edulis* f. *flavicarpa* segundo Junqueira *et al.* (2003).

Segundo Meletti *et al.* (2005), a resistência ao nematóide *Meloidogyne incognita* tem sido encontrada em espécies como *P. edulis*, *P. cincinnati* e *P. caerulea*.

Ademais, as sementes dos maracujás silvestres apresentam baixa emergência, devido à dormência, dificultando a propagação eficiente de mudas para a produção de porta-enxertos (SANTOS, 2016) ou para outros estudos, e também para a produção comercial de frutos.

1.4. O PROJETO DA EMBRAPA CERRADOS

Há um potencial intrínseco nas espécies silvestres de maracujá para a utilização de seus frutos *in natura*, como ornamentais ou para o uso medicinal, porém, de acordo com Faleiro *et al.* (2012, p. 10): “para explorar tamanho potencial, trabalhos de prospecção, coleta, conservação e caracterização são estratégicos e fundamentais”.

Com o nome ‘Desenvolvimento tecnológico para uso funcional das Passifloras silvestres’, o projeto da EMBRAPA tem como objetivo principal ampliar os conhecimentos acerca de algumas espécies silvestres de maracujás, escolhidas com base nos resultados preliminares, e desenvolver tecnologias para melhorar o aproveitamento de seu uso funcional, tendo em vista a cadeia produtiva.

P. tenuifila e *P. setacea* foram selecionadas, junto a outras espécies, pela rede Embrapa Cerrados pelas qualidades funcionais e medicinais de seus frutos em virtude da carência de informações sobre as espécies do gênero, quanto à fisiologia da germinação, quanto às estratégias de conservação de germoplasma através de sementes e

quanto à disponibilidade de tecnologias alternativas para a produção de mudas certificadas, através da micropropagação e para a conservação *in vitro* de germoplasma, justificado pela dificuldade encontrada para atender à demanda da produção de mudas, devido às características apresentadas pelas sementes quanto à dormência, curta viabilidade, baixa tolerância à desidratação e/ou ao armazenamento em temperaturas negativas por longos períodos, como ocorrido por Meletti *et al.* (2005).

Dentre os resultados já obtidos pelo projeto, podemos citar o aumento no vingamento de mudas em viveiros e o aumento na produtividade (EMBRAPA, 2016). Programas de melhoramento da Embrapa vêm buscando a seleção de populações de *P. setacea* e *P. nítida* para obter frutos maiores e, por conseguinte, maior rentabilidade para o produtor e aceitação pelo consumidor (FALEIRO *et al.*, 2008).

O projeto conta com diversos parceiros, como universidades, institutos e outros setores da Embrapa. Uma das atividades ao qual a UFSC ficou encarregada está relacionada à germinação, cultura e conservação *in vitro* das espécies do presente trabalho, dentro do Plano de Ação 2. Como, durante os primeiros experimentos, as sementes não germinavam *in vitro*, os experimentos com germinação *ex vitro* deste trabalho se mostraram primordiais.

1.5. FISILOGIA DAS SEMENTES

Uma das adaptações das plantas ao conquistar o ambiente terrestre envolve a produção de sementes, as quais permitem ao embrião sobreviver por longos períodos até que as condições ambientais se tornem favoráveis para seu crescimento e desenvolvimento (FINKELSTEIN, 2010).

As sementes das angiospermas, de modo geral, são constituídas pelo embrião, endosperma e um envoltório, os quais possuem diferentes origens: o embrião é formado pela fusão de gametas haplóides parentais (um núcleo espermático masculino com a oosfera); o endosperma é produzido pela fusão do outro núcleo espermático do grão de pólen com os dois núcleos polares femininos, formando um tecido triploide; enquanto o envoltório é proveniente das células diplóides da planta-mãe (MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1989).

Durante seu desenvolvimento junto à planta-mãe, as sementes passam por determinadas etapas até atingirem o ponto ideal para se dispersarem e se estabelecerem no meio. Depois da fecundação, o zigoto começa uma intensa fase de divisão e diferenciação celular, as quais originarão os tecidos do embrião. Esta primeira fase, denominada histodiferenciação, embriogênese ou morfogênese, termina ao cessar a

síntese de material genético e a atividade mitótica (KERBAUY, 2008; FINKELSTEIN, 2010).

Em seguida, dá-se início a fase de maturação, marcada pela expansão celular, através da captação de água e acúmulo de compostos de reserva, nos tecidos de reserva, resultando no aumento de matéria seca da semente. Nessa fase as divisões celulares cessam e os compostos de armazenamento são acumulados. Nesta altura, tem-se o ponto de maturidade fisiológica (KERBAUY, 2008).

A fase de dessecação é marcada por uma expressiva desidratação, levando as sementes a uma taxa de 5-15 % de teor de água. Além deste fato, a conexão com a planta-mãe é rompida, deixando as sementes sem o aporte trófico parental. Como consequência, o metabolismo do embrião diminui (BRYANT, 1989; KERBAUY, 2008). Esta fase é finalizada com a entrada da semente em um processo de dormência, provocada pela diminuição da transcrição gênica e consequente síntese protéica. Nessa fase final, as sementes ortodoxas tornam-se tolerantes à dessecação e a semente, pela perda de até mais que 90% da água, dependendo da espécie, que faz o metabolismo cessar, entra em estado quiescente. Em certos casos as sementes se tornam dormentes e diferentemente das sementes quiescentes, que germinam quando hidratadas, necessitam de um tratamento adicional para que a germinação ocorra. Assim, as duas últimas fases do desenvolvimento das sementes viáveis provêm as sementes com os recursos necessários para sustentar a germinação e também com a capacidade para retardar a germinação por semanas e até anos antes de reiniciar o crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2009).

1.5.1. Germinação

A germinação é um mecanismo/processo no qual alterações fisiológicas e morfológicas acarretam no despertar do embrião, e sua consequente retomada no desenvolvimento (MIRANSARI; SMITH, 2014). Para isso, a semente necessita absorver água, o que causa a expansão do embrião, e quando a radícula se alonga e rompe as camadas da semente, deixando a testa, o processo de germinação está completo (HERMANN *et al.*, 2007).

Para que a germinação ocorra, a semente precisa preencher alguns pré-requisitos, como possuir disponibilidade à água e uma reserva energética e nutricional adequada. Para essa reserva tornar-se disponível ao embrião, a ativação de enzimas específicas se faz necessário (MIRANSARI; SMITH, 2014). Além do mais, é necessário que estímulos inibitórios não estejam presentes, ou, caso estejam, estes

devem ser menos intensos que os sinais opostos (TAIZ; ZEIGER, 2009).

1.5.2. Dormência

A dormência das sementes impede a germinação em condições desfavoráveis, sendo uma importante adaptação das plantas às adversidades ambientais, pois suprime o crescimento e desenvolvimento até que as condições se tornem favoráveis à sobrevivência do embrião e da futura plântula (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Na semente, a dormência é determinada por fatores genéticos, sob a influência de fatores ambientais, tais como o resfriamento, a presença ou ausência de luz (dependendo da espécie) e o armazenamento a seco, processo conhecido como pós-maturação (TAIZ; ZEIGER, 2009; FINKELSTEIN, 2010). Durante a dormência, a planta mantém pouca atividade metabólica (GRAEBER *et al.*, 2012).

Os fisiologistas dividem a dormência das sementes em primária e secundária. A primeira se dá quando a semente já sai da planta-mãe em estado dormente, enquanto a última adquire esta capacidade dormente após ser liberada no meio ambiente, caso as condições ambientais não sejam favoráveis (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Outra maneira de classificar a dormência é segundo sua origem. Quando a dormência é intrínseca ao embrião, tem-se a *dormência do embrião*. Ao ser exercida pelos tecidos ao redor do embrião (endosperma, pericarpo ou testa), é denominada *dormência imposta pela testa*, a qual pode ser dividida de acordo com o mecanismo envolvido, segundo Taiz e Zeiger (2009, p. 663): (a) “impedimento da absorção de água; (b) restrição mecânica; (c) interferência nas trocas gasosas; (d) retenção de inibidores, e; (e) produção de inibidores”.

1.5.3. Fitormônios

Os requisitos básicos para o crescimento das plantas são: luz, água e nutrientes do solo e uma concentração adequada de ar atmosférico, notadamente de dióxido de carbono. Contudo, para um crescimento efetivo e ordenado, os organismos pluricelulares necessitam da comunicação entre células, tecidos e órgãos além da interação com fatores endógenos e exógenos, como a composição química, em ambos os casos, e a quantidade e qualidade de luz e temperatura atuando no segundo caso (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

Os fitormônios (ou hormônios vegetais) atuam, segundo Raven, Evert e Eichhorn (2014, p. 638) na “regulação e coordenação do metabolismo, do crescimento e da morfogênese” nas plantas. Produzidos em diversos órgãos e tecidos, os fitormônios, podem atuar

em seu local de síntese, ou serem transportados e induzir uma resposta química em outra parte do organismo. Pequenas concentrações são suficientes para sua efetividade, porém, cada órgão ou tecido têm sua sensibilidade específica aos fitormônios, assim como cada fase de desenvolvimento pode exigir uma concentração diferenciada para surtir o efeito desejável (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

O crescimento e desenvolvimento das plantas são regulados por diferentes hormônios, os quais atuam tanto individualmente quanto em conjunto (TAIZ; ZEIGER, 2009). Giberelinas, brassinoesteróides, citocininas e etileno promovem a germinação, enquanto o ácido abscísico regula negativamente a germinação (HERMANN *et al.*, 2007). A seguir, serão abordados os fitormônios envolvidos no processo dormência/germinação.

a) Giberelinas

As giberelinas constituem um grupo com mais de 136 compostos, definidas por sua estrutura química, sendo o ácido giberélico (GA_3) a mais estudada. Descobertas primeiramente em fungos, estão presentes nas bactérias, assim como nas plantas. Nos vegetais superiores, atuam nas mais diversas funções, como, por exemplo, no crescimento caulinar, na floração e frutificação, na mobilização da reserva de endosperma e germinação de sementes entre outras (KERBAUY, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009).

As giberelinas desempenham importante papel na germinação das sementes, pois, são produzidas pelo eixo embrionário e vão estimular, através da produção de enzimas hidrolíticas (alfa-amilase e outras enzimas hidrolíticas), o metabolismo de degradação das reservas das sementes, que vão nutrir e sustentar o desenvolvimento do eixo embrionário (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Em sementes dormentes, a aplicação de giberelinas bioativas pode substituir a necessidade pelo frio ou por luz, estimulando a germinação, o que acarreta a expansão radicular para além das camadas do envoltório (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

b) Citocininas

As citocininas são derivadas de uma base nitrogenada púrica, a adenina, e, diferente das giberelinas, são definidas por sua atividade, e não pela composição química. Participam, principalmente, na promoção da divisão celular, no atraso da senescência foliar e na quebra da dormência das gemas laterais. A zeatina é a citocinina natural mais estudada, enquanto que a cinetina e o 6-benzilamino purina (BAP) são

as citocininas sintéticas mais utilizadas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

c) Ácido abscísico

O ácido abscísico (ABA) está envolvido em processos de fechamento estomático, no estresse hídrico, maturação de sementes e na manutenção da dormência de sementes e gemas.

É o grande responsável pela dormência das sementes, as quais, durante sua fase de maturação, têm seu nível de ABA aumentado. O hormônio participa da síntese de proteínas e lipídeos de reserva nas sementes, cujo resultado as leva ao estado de dormência, previne a germinação precoce e promove a tolerância à dessecação (TAIZ; ZEIGER, 2009; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

1.5.4. O balanço ABA/GA

Dormência ou germinação ocorrem devido à interação de diversos sinais, os quais promovem ou inibem um ou outro evento. Por exemplo, sinais germinativos (presença de água ou determinadas concentrações hormonais) inibem os sinais opostos, cujos efeitos levariam à dormência, portanto, a germinação prevaleceria. O balanço entre ABA e GA é um fator chave para a manutenção da dormência (MIRANSARI; SMITH, 2014).

Uma alta taxa de ABA, produzido durante o desenvolvimento da semente, mantê-la-a dormente, através da síntese de reservas e da inibição da ação das GAs. Nesta situação, o embrião maduro permaneceria viável por longos períodos, à espera de condições apropriadas para o seu desenvolvimento (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A mudança na razão ABA/GA ocorre devido à: (a) queda na concentração de ABA e (b) síntese de GA. Durante a fase de pós-maturação, o ABA vai sendo degradado naturalmente e, ao ser reidratado, o embrião começa a sintetizar GA, levando à diminuição na razão entre ABA e GA. O GA, agora, proverá energia para o embrião recém hidratado prosseguir com a germinação (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Normalmente o teor de ácido abscísico (ABA) das sementes é muito baixo no começo da embriogênese, atingindo níveis mais elevados na fase intermediária, diminuindo gradualmente na medida em que a semente atinge maturidade. Assim entre a fase intermediária e tardia da embriogênese existe o acúmulo de alto nível de ABA, que inibe a germinação precoce das sementes nos frutos, quando o embrião ainda não completou seu desenvolvimento e está no estágio embriogênico (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Segundo esses autores, durante a dessecação da semente o ABA desempenha a função de promover a aquisição de tolerância à dessecação pela semente, pois a dessecação pode danificar as membranas e outros constituintes celulares. A partir do momento em que as sementes começam a perder água, os embriões acumulam açúcares e as proteínas abundantes da fase tardia da embriogênese (LEA). Essas proteínas contribuem para formar um líquido altamente viscoso e de difusão muito lenta, que restringe as reações químicas dentro das células do embrião, promovendo a tolerância à dessecação. A síntese das proteínas LEA e de lipídeos de reserva é controlada pelo ABA, que mantém o embrião maduro em estágio de dormência até que ocorram as condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento. A dormência embrionária se dá devido à presença de inibidores, em especial o ABA, bem como à ausência de promotores de crescimento, como as giberelinas (GA).

As reações de síntese e catabolismo de ABA e GA são catalisadas por isoenzimas, cuja expressão é controlada pelos fatores ambientais como o dessecamento (pós-maturação), baixas temperaturas e luz. Parte do ABA presente nas sementes pode ser derivado no tecido materno da planta, constituindo a maior parte do ABA presente nas sementes em desenvolvimento, com a função de inibir a viviparidade na fase intermediária da embriogênese. O embrião da semente produzirá seu próprio ABA durante a maturação da semente e após a embebição. Outros hormônios podem contribuir para o efeito global, o pico de ABA em sementes coincide com queda nos níveis de AIA (ácido indolacético) (TAIZ; ZEIGER, 2009).

O balanço ABA/GA determina a dormência das sementes e é controlado pelos fatores de transcrição. Para que a germinação seja promovida pelo GA é necessário que sejam destruídas as proteínas da família DELLA, responsáveis pela repressão da germinação, pelo aumento da expressão de proteínas que promovem a síntese de ABA. O aumento do ABA aumenta então a expressão de fatores de transcrição e de proteínas DELLA, que inibem a germinação. O ABA inibe a síntese dessas enzimas hidrolíticas induzidas pelo GA, inibindo a transcrição do mRNA da alfa-amilase, impedindo a germinação. O ABA pode agir ativando a expressão gênica do gene que codifica a proteína VP1, que age como repressor da transcrição de alguns genes regulados pelo GA ou pode reprimir a expressão do gene GAMYB (induzida pelo GA), que está envolvido na expressão da alfa-amilase, necessária para a degradação do amido (TAIZ; ZEIGER, 2009).

1.6. ESTUDOS SOBRE GERMINAÇÃO, DORMÊNCIA E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE *PASSIFLORA* SPP.

1.6.1. Germinação de sementes de *Passiflora* spp.

Devido às dificuldades de germinação e conservação de sementes, diversos autores vêm pesquisando técnicas para a quebra de dormência e uso de reguladores de crescimento, visando otimizar a germinação das sementes das espécies de maracujás. Muitos autores vêm trabalhando com a germinação das espécies do gênero (ALVES *et al.*, 2006; DELANOY *et al.*, 2006; FERRARI *et al.*, 2008; MARQUES, 2009; ZUCARELI *et al.*, 2009b; SANTOS *et al.*, 2016). Segundo Miranda, Perea e Magnitskiy (2009), as sementes de frutos recém colhidos podem apresentar taxas de germinação entre 90-100% em algumas espécies, porém podem germinar menos que 44% dependendo da espécie ou variedade, ou ainda não germinar, como em *P. alata* no trabalho de Pereira *et al.* (2011). Esse fato sugere que haja dormência nas sementes de, pelo menos, algumas espécies de *Passiflora*.

Os métodos pré-germinativos testados para a quebra da dormência têm uma ampla variação segundo cada autor, e incluem a embebição ou aplicação de reguladores vegetais ou água, o armazenamento em diferentes temperaturas, a escarificação e a ausência ou presença de luz. Assim, algumas pesquisas têm recomendado a remoção do arilo (*P. alata*, *P. gibertii*), a escarificação com lixa fina (*P. cincinnata*, *P. alata*), tratamento térmico com água a 40, 50 ou 60°C (*P. edulis*, *P. cincinnata*), semeadura em temperaturas de 25°C ou alternada 20-30°C (*P. alata*, *P. cincinnata*), estratificação a frio (*P. setacea*, *P. alata*, *P. cincinnata*), estádios de maturação distintos (*P. edulis*), utilização de fitormônios como GA₃ (*P. setacea*, *P. alata*), GA₄ (*P. edulis*, *P. alata*) e promalina (*P. cincinnata*), armazenamento em câmara fria (*P. alata*, *P. setacea*, *P. edulis*), câmara seca e ambiente (*P. alata*) (ARAÚJO *et al.*, 2007; FERRARI *et al.*, 2008; JUNGHANS; VIANA; JUNGHANS, 2008; AMARO *et al.*, 2009; ZUCARELI *et al.*, 2009a; COSTA; SIMÕES; COSTA, 2010; OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2011; WELTER *et al.*, 2011).

De acordo com Miranda, Perea e Magnitskiy (2009), as sementes de diferentes espécies de maracujás apresentam respostas diferentes à luz, sendo algumas inibidas de germinar na presença de luz. Em seu trabalho, Marques (2009) concluiu que a germinação de sementes de *P. setacea* não foi afetada pela presença ou ausência de luz. Dentre os fitormônios, a utilização de giberelinas, como o ácido giberélico, é o mais comum (ISUTSA, 2004; DELANOY *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*,

2016). A utilização de citocininas foi testada independente (ALVES, 2006), ou em conjunto com giberelinas (FERRARI, 2008; MARQUES, 2009; ZUCARELI *et al.*, 2009b). Os diferentes métodos de escarificação apresentaram resultados controversos segundo Miranda, Perea e Magnitskiy (2009).

1.6.2. Armazenamento e conservação de sementes de *Passiflora* spp.

Os trabalhos de armazenamento e conservação de sementes de maracujás têm como base sua retirada dos frutos e a remoção do arilo. Os passos seguintes variam conforme o autor. A temperatura de armazenamento é um método recorrente, sendo testada em temperatura ambiente (20-25°C), câmara fria (10°C), geladeira (5°C) e em nitrogênio líquido (-196°C) (PEREIRA *et al.*, 2008).

A criopreservação de sementes de maracujás vem sendo estudada para uma ampla gama de espécies, tanto as comerciais quanto as silvestres (OSPINA *et al.*, 2000; MELETTI *et al.*, 2007; GONZÁLEZ-BENITO; AGUILAR; ÁVILA, 2009; VEIGA-BARBOSA *et al.*, 2013). Os autores demonstraram que o teor de água da semente é um importante aspecto a ser considerado para o estabelecimento de protocolos de criopreservação, e cada espécie tem seu valor ótimo de tolerância à desidratação.

A técnica de criopreservação é eficiente e prática para a conservação de recursos fitogenéticos, a longo prazo, caracterizando-se na conservação de sementes e embriões zigóticos em temperaturas ultra-baixas (-196° C a -150° C) (GONZÁLEZ-BENITO, 1998; SANTOS, 2000). Pádua *et al* (2011), estudando a germinação de *P. setacea*, observaram maior viabilidade em sementes conservadas sob temperaturas subzero (-20 e -196 °C). Meletti *et al* (2004, 2007) realizaram experimentos de crioconservação (-196°C) com diversas espécies de *Passiflora*, e observaram um comportamento variável entre as espécies, favorecendo a germinação para a espécie *P. edulis*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Prover conhecimentos sobre germinação e conservação das sementes de *Passiflora tenuifila* e *Passiflora setacea* e desenvolver protocolos de conservação e cultura *in vitro* de *Passiflora tenuifila*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar o efeito do armazenamento em baixa temperatura (5°C) sobre a germinação das sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea* mantidas nos frutos e em sacos plásticos.
2. Verificar o efeito de ácido giberélico e 6-benzilaminopurina sobre a germinação das sementes de *P. tenuifila*.
3. Verificar o efeito do armazenamento dos frutos ao ar livre, a 25°C sobre a germinação das sementes de *P. tenuifila*.
4. Verificar o efeito da criopreservação sobre a germinação das sementes de *P. tenuifila*.
5. Desenvolver protocolo para a germinação *in vitro* das sementes de *P. tenuifila*.
6. Verificar o efeito do armazenamento das sementes de *P. tenuifila* envolvidas pelo endocarpo e conservadas *in vitro* a 5°C e 25°C sobre a germinação.
7. Verificar o efeito de fontes de carbono sobre o crescimento *in vitro* das microplantas de *P. tenuifila*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas sementes de plantas de *P. setacea* e *P. tenuifila* do banco de germoplasma de Passifloras, cedidas pela Embrapa Cerrados, e frutos de *P. tenuifila* obtidos das plantas adultas cultivadas na casa de vegetação da UFSC.

3.2. GERMINAÇÃO E ARMAZENAMENTO *EX VITRO* DAS SEMENTES DE *P. TENUIFILA* E *P. SETACEA*

3.2.1. Efeito do armazenamento em geladeira (5°C) de frutos e sementes em sacos plásticos na germinação das sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea*

Os frutos maduros foram embalados em sacos plásticos ou tiveram suas sementes removidas que, após a remoção do arilo foram armazenadas em sacos plásticos a 5°C. Após períodos de 30, 80 e 130 dias, as sementes foram removidas dos frutos e das embalagens plásticas, que foram utilizadas para a determinação do teor de água e realização dos testes de germinação. As sementes foram colocadas para germinar em copos de polietileno de 60 ml, contendo 28 g de solo adubado irrigado com 8 ml de água. Em seguida, os copos plásticos foram colocados em bandejas pet retangulares de 235 mm x 169 mm x 100 mm, com tampa e foram mantidos em casa de vegetação, sob iluminação natural. Nesses experimentos as sementes não foram embebidas em água ou ácido giberélico antes de serem colocadas para germinar. O teor de água e a porcentagem de germinação também foram determinados no início do experimento, no tempo de armazenamento igual a zero (t₀), antes de serem armazenadas a 5°C. Os experimentos foram colocados para germinar entre janeiro e março/2013. Foram utilizadas 5 repetições de 25 sementes por tratamento, exceto quando especificado.

3.2.2. Efeito de ácido giberélico e 6-benzilaminopurina na germinação das sementes de *P. tenuifila*

As sementes foram removidas dos frutos maduros, tiveram os arilos removidos e foram imediatamente submetidas aos diferentes tratamentos de imersão em água ou em soluções de ácido giberélico (GA₃), 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0,31%; 0,62%; 1,25% e 2,5% (correspondente, respectivamente, às concentrações de 9,03 mM; 18,06 mM; 36,12 mM e 72,25 mM de GA e a 13,88 mM; 27,77 mM; 55,55 mM e 111 mM de BAP) por períodos de 1 ou 5 dias.

Em seguida, foram colocadas para germinar conforme descrito no item 3.2.1. Os experimentos foram mantidos em casa de vegetação, sob iluminação natural. Foram utilizadas 5 repetições de 25 sementes por tratamento, exceto quando especificado. Os experimentos foram montados em dezembro de 2012 e as avaliações realizadas até junho/2013.

3.2.3. Efeito do armazenamento dos frutos ao ar livre a 25°C na germinação das sementes de *P. tenuifila*

No experimento 1, os frutos maduros foram coletados, em setembro de 2013 e no experimento 2, em Agosto de 2014. Os frutos foram pesados e armazenados em caixas de papelão, ao ar livre a 25°C. Semanalmente os frutos foram pesados, para determinação das porcentagens de redução no teor de água durante o período de armazenamento. No início do experimento 1 e após períodos de 45 dias, 7 meses e 10 meses de armazenamento foram realizados os testes de determinação do teor de água e de germinação. As sementes foram então removidas dos frutos, tiveram os arilos removidos, tanto para a determinação do teor de água como para os testes de germinação. Para os testes de germinação foram previamente embebidas por 5 dias a 25°C, em solução de ácido giberélico 2,5% e depois colocadas para germinar conforme descrito no item 3.2.1. As condições de germinação foram 25°C, com iluminação natural. Foram utilizadas de 4-5 repetições com 14-30 sementes cada, por tratamento.

No experimento 2, os teores de água das sementes foram determinados imediatamente após a coleta e após períodos de 7 e 12 meses de armazenamento. Os testes de germinação das sementes foram conduzidos após períodos de 8; 9,5; 12 e 13,5 meses de armazenamento. As condições de germinação foram 25°C, com iluminação natural. Foram utilizadas 3-5 repetições com 17-27 sementes cada, por tratamento.

3.2.4. Efeito da criopreservação na germinação das sementes de *P. tenuifila*

As sementes de frutos maduros, armazenados por 16 meses a 25°C ao ar livre tiveram os arilos removidos e foram imediatamente colocadas nos cryovials de 2 ml e submetidas à imersão em nitrogênio líquido (-196°C) por, no mínimo, uma hora, após o que foram removidas do nitrogênio líquido e embebidas, por 5 dias, em solução aquosa de 2,5% de ácido giberélico. Em seguida foram colocadas para germinar da

mesma forma como descrito no item 3.2.1. O experimento foi mantido em câmara de crescimento a 25°C, nas mesmas condições descritas no item 3.3.1. O controle foi realizado com sementes não criopreservadas embebidas em solução de 2,5% de ácido giberélico. Foram realizadas 5 repetições com 20-21 sementes cada, por tratamento.

3.3. GERMINAÇÃO E ARMAZENAMENTO *IN VITRO* DAS SEMENTES DE *P. TENUIFILA*

3.3.1. Germinação *in vitro* das sementes

No experimento *in vitro*, as sementes de um fruto fresco (recém colhido), já com o arilo removido e após cinco dias de embebição em solução aquosa contendo 2,5% de GA, foram postas para germinar em tubos de ensaio de 150 mm x 25 mm, contendo 8 ml de meio de cultura Murashige e Skoog (1962) (MS), suplementado com 88,5 mM de glicose, 0,2% de Phytigel™ e 1,25 µM AIB (ácido indolbutírico). Os tubos de ensaio foram cobertos com filme de polipropileno (76 mm x 76 mm) e presos com elásticos de borracha. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2°C, sob fotoperíodo de 16 horas, provido por lâmpadas fluorescentes Philips TDL (22.3 µmol.m⁻².s⁻¹) e umidade relativa de 70%. Estas condições foram utilizadas em todos os experimentos de cultura *in vitro*, exceto quando especificado. Foram utilizadas 6 repetições com 6 sementes cada, por tratamento.

3.3.2. Efeito do armazenamento das sementes de *P. tenuifila* envolvidas pelo endocarpo e mantidas *in vitro* na germinação

Os frutos maduros foram lavados com água da torneira e detergente neutro, enxaguados 4 vezes, e, em fluxo laminar, imersos em solução comercial de hipoclorito de sódio (Q-Boa) com 2,5% (v/v) de cloro ativo por 10 min. Em seguida, as camadas mais externas dos frutos foram separadas com o auxílio de bisturi, o que é facilmente realizado em *P. tenuifila*, e os endocarpos foram inoculados em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) suplementado com 2% de Phytigel™ e deixados em geladeira (5°C) ou em temperatura ambiente (25°C), nas mesmas condições descritas no item 3.3.1. Após 4, 8, 17 e 18 meses os endocarpos foram removidos do meio de cultura, abertos com auxílio de bisturi para retirada das sementes, as quais tiveram os arilos removidos e foram utilizadas para a determinação do teor de água ou colocadas para embeber por 5 dias em solução de 2,5% de ácido giberélico e, em seguida, colocadas para germinar como descrito no item 3.2.1. As

condições de germinação foram 25°C, com iluminação natural. Foram utilizadas 4-5 repetições com 25-30 sementes cada.

3.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA DAS SEMENTES

As sementes foram retiradas dos frutos, tiveram o arilo removido esfregando-as em papel toalha. Em seguida foram determinadas as massas frescas e postas em estufa a 103 °C por, no mínimo, 16 horas para posterior determinação das massas secas. Foram utilizadas de 4 a 5 repetições de 15 a 25 sementes cada por tratamento. O teor de água foi calculado através da fórmula:

$$\text{Teor de Água} = \frac{(M_f - M_s)}{M_f} * 100$$

Onde M_f representa a massa fresca e M_s a massa seca.

3.5. EFEITO DE FONTES DE CARBONO NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DAS MICROPLANTAS DE *P. TENUIFILA*.

Para verificar o efeito de fontes de carbono sobre o crescimento dos segmentos apicais, os explantes com 2,5 cm de comprimento, contendo a gema apical, foram removidos de plantas axênicas de 8 semanas de idade, cultivadas *in vitro* e transferidos, após a desinfecção, para os tubos de ensaio de 150 mm x 25 mm, contendo 8 ml de meio de cultura MS, suplementado com 88,5 mM de sacarose ou glicose, 0,2% de Phytigel™ e 1,25 µM AIB (ácido indolbutírico). Os tubos de ensaio foram cobertos com filme de polipropileno (76 mm x 76 mm), presos com elásticos de borracha. As culturas foram mantidas em sala de crescimento como descrito no item 3.3.1 e avaliadas quanto à altura, número de ramos, número de folhas e porcentagens de formação de ramos, raízes e calos.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram montados de acordo com o delineamento estatístico completamente casualizado. Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste *t* de Student, ao nível de 5% de probabilidade, quando a comparação se restringiu a apenas dois tratamentos, ou da análise de variância simples (ANOVA) ou multifatorial, com separação de médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, quando mais de dois tratamentos foram comparados. Quando pertinente, os dados em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada da porcentagem antes da realização da análise estatística. Os cálculos foram realizados com o auxílio do EXCEL e *software* estatístico STATISTICA® versão 8.0.

4. RESULTADOS

4.1. GERMINAÇÃO E CONSERVAÇÃO *EX VITRO* DE SEMENTES DE *P. TENUIFILA* E *P. SETACEA*

4.1.1. Efeito do armazenamento em geladeira (5°C) de frutos e sementes em sacos plásticos na germinação de sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea*

Com o objetivo de testar o efeito do armazenamento a 5°C na germinação das sementes, neste experimento uma parte dos frutos frescos coletados foi armazenada em sacos plásticos a outra parte dos frutos foi despulpada, as sementes tiveram os arilos removidos e foram armazenadas em sacos plásticos, sendo mantidos ambos em geladeira (5°C).

O teor de água e a viabilidade das sementes foram determinados no início do experimento, imediatamente após a coleta dos frutos e nos três períodos de armazenamento: 30, 80 e 130 dias. Após os respectivos períodos de armazenamento, as sementes, removidas dos frutos e dos sacos plásticos, foram colocadas imediatamente para germinar em solo e mantidas em casa de vegetação, pois em experimentos preliminares não germinaram em condições controladas, a 25°C.

Na Tabela 1 estão os resultados dos teores de água das sementes observados no início do experimento e após 30, 80 e 130 dias de armazenamento em sacos plásticos ou nos frutos. Verifica-se que, para *P. tenuifila*, os teores de água das sementes armazenadas em sacos plástico tendeu a diminuir em relação ao das sementes que não foram submetidas ao armazenamento, no início do experimento, porém as diferenças não foram estatisticamente significativas. Os teores de água das sementes armazenadas nos frutos, entretanto, aumentaram significativamente após 80 e 130 dias de armazenamento (17,7% e 22,59%, respectivamente) em relação ao tempo zero, no início do experimento (11,05%).

Para *P. setacea*, os dados indicam que os teores de água das sementes armazenadas em sacos plásticos por 30, 80 e 130 dias decresceram significativamente (15,58%, 10,12% e 8,41%, respectivamente) em relação ao teor de água detectado no tempo zero, no início do experimento (21,83%), mas os teores de água das sementes armazenadas nos frutos por 80 e 130 dias permaneceram estatisticamente semelhantes (23,21% e 18,47%), ao observado no início do experimento (21,83%).

Tabela 1. Efeito do armazenamento a 5°C de frutos e sementes em sacos plásticos sobre o teor de água das sementes de *Passiflora tenuifila* e de *Passiflora setacea* não armazenadas ou após 30, 80 e 130 dias de armazenamento.

Tipo de Armazenamento	Tempo (dias)	<i>P. tenuifila</i> ^z	<i>P. setacea</i> ^z
	0	11,1 ± 0,6 a	21,8 ± 2,0 cd
Sementes em sacos plásticos	30	14,1 ± 1,7 ab	15,6 ± 1,8 b
	80	10,8 ± 1,1 a	10,1 ± 0,6 a
	130	9,7 ± 2,2 a	8,4 ± 1,8 a
Sementes nos frutos	30	11,9 ± 2,7 a	16,4 ± 0,9 b
	80	17,8 ± 1,1 bc	23,2 ± 2,2 d
	130	22,6 ± 3,7 c	18,5 ± 2,7 bc

^zMédia ± desvio padrão do teor de água de 4 repetições de 25 sementes cada. Letras iguais na coluna indicam que os tratamentos não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p≤0,05).

Os padrões de variação do teor de água das sementes em função do tempo de armazenamento são representados nos gráficos das Figuras 1, para sementes de *P. tenuifila* e Figura 2, para sementes de *P. setacea*. Os padrões de variação do teor de água das sementes mantidas nos frutos foram semelhantes em ambas as espécies no que concerne ao aumento do teor de água das sementes mantidas nos frutos e a diminuição do teor de água das sementes armazenadas em sacos plásticos.

Na Figura 3 estão representados os resultados dos teores de água das sementes de *P. tenuifila* em um segundo experimento realizado, em que foram determinados os teores de água das sementes removidas dos frutos frescos logo após a coleta, no tempo zero do experimento, e depois de armazenados a 5°C por 1, 2, 5 e 6 meses. Após 60 dias de armazenamento, os teores de água das sementes dentro dos frutos começaram a aumentar com o tempo de armazenamento, atingindo até 41,12%, no sexto mês de armazenamento (180 dias). No período correspondente a 130 dias de armazenamento, o teor de água das sementes correspondeu a um valor que está entre 20% e 25%, similar ao observado na Tabela 1, de 22,59%, para as sementes armazenadas nos frutos, confirmando o aumento do teor de água das sementes quando armazenadas nos frutos por períodos acima de 60 dias.

Os resultados indicam que nas sementes armazenadas em sacos plásticos houve redução significativa no teor de água apenas em *P. setacea*, enquanto que os teores de água das sementes mantidas nos

Figura 1. Variação do teor de água de sementes de *Passiflora tenuifila* com o decorrer do período de armazenamento a 5°C, nos frutos e em sacos plásticos. Valores são médias de 4 repetições de 25 sementes por tratamento. As letras comparam os tratamentos no período de armazenamento de 130 dias teste t de Student ($p \leq 0,05$).

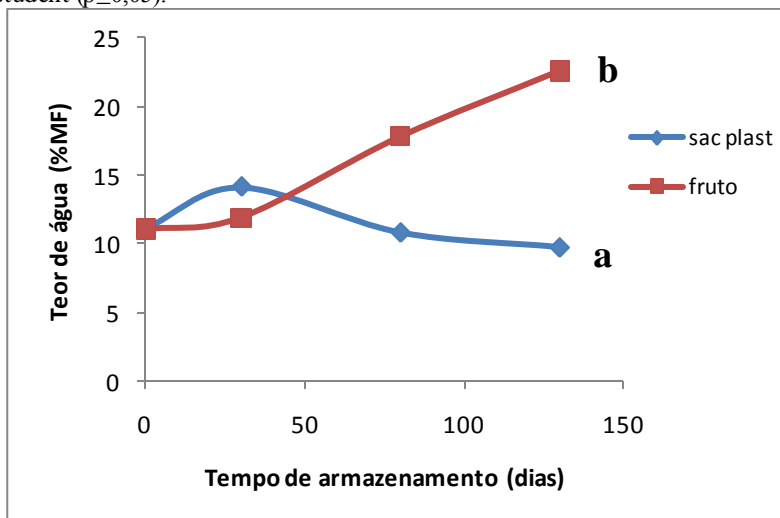
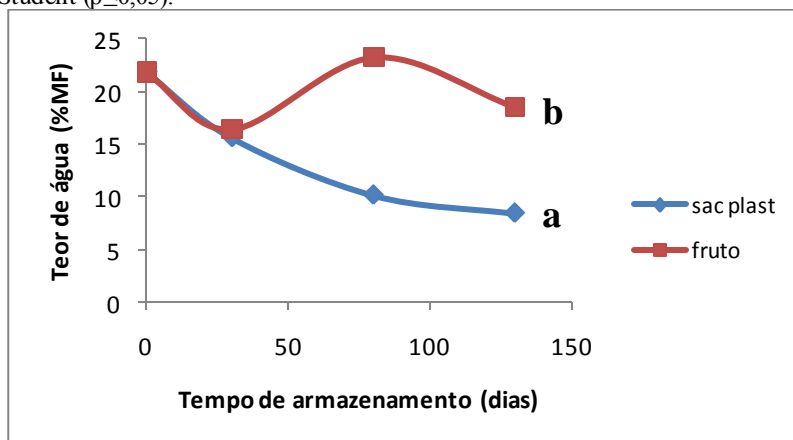
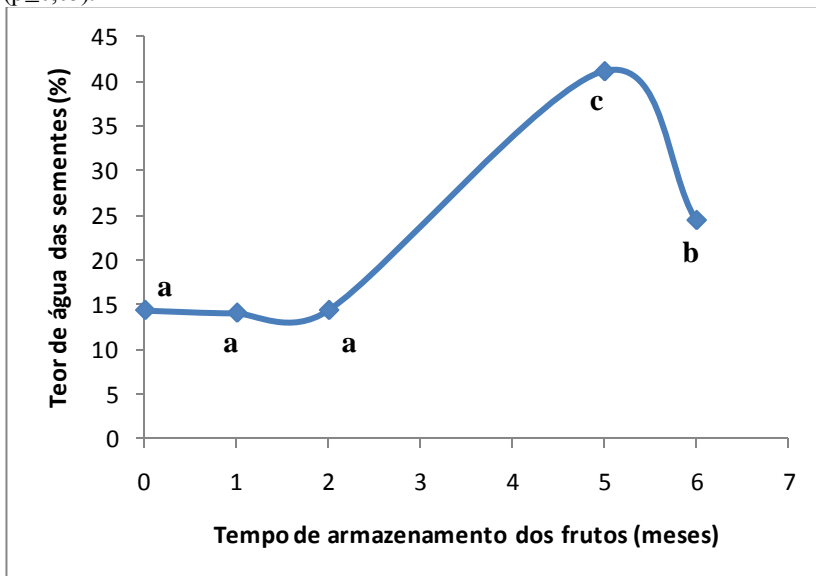


Figura 2. Variação do teor de água de sementes de *Passiflora setacea* com o decorrer do período de armazenamento a 5°C, nos frutos e em sacos plásticos. Valores são médias de 4 repetições de 25 sementes por tratamento. As letras comparam os tratamentos no período de armazenamento de 130 dias teste t de Student ($p \leq 0,05$).



frutos aumentaram com o tempo de armazenamento, em ambas as espécies, aumento esse confirmado, em *P. tenuifila*, em dois experimentos conduzidos.

Figura 3. Variação no teor de água de sementes de *Passiflora tenuifila* removidas dos frutos frescos (tempo zero) ou mantidas nos frutos a 5°C por períodos de 1, 2, 5 e 6 meses. Valores são médias de 5 repetições com 15 sementes cada. As letras comparam os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Os resultados obtidos nos experimentos de germinação, após os diferentes períodos e tipos de armazenamento a 5°C são apresentados na Tabela 2. A análise de variância multifatorial, para investigar a possível interação entre os fatores tipos de armazenamento e tempos de armazenamento, para cada espécie, indicou interações significativas entre esses dois fatores (para *P. tenuifila* $p < 0,01$; para *P. setacea* $p < 0,01$). No tratamento em que as sementes de ambas as espécies foram removidas dos frutos e colocadas imediatamente para germinar, sem passarem por qualquer tipo de armazenamento, as taxas de germinação foram de 5,01% para *P. tenuifila* e 50,5% para *P. setacea*, sendo a diferença estatisticamente significativa. Entretanto, as porcentagens de germinação de sementes de *P. tenuifila* aumentaram significativamente aos 80 dias de armazenamento a 5°C, tanto para as sementes armazenadas em sacos plásticos (25,6%) como para as mantidas nos

frutos (73,6%). O mesmo ocorreu com as sementes de *P. setacea*, cujas taxas de germinação das sementes em sacos plásticos aumentaram progressivamente com o período de armazenamento alcançando 91,2%, aos 130 dias e 83,2%, aos 80 dias, no caso das sementes mantidas nos frutos.

Tabela 2. Efeito do armazenamento a 5°C de frutos e sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea* sobre a germinação (%). Dados aos 84 dias do início do experimento.

Tipo de Armazenamento	Tempo (dias)	<i>P. tenuifila</i> ^z	<i>P. setacea</i> ^z
	0	5,01 ± 1,80 Aa	50,5 ± 8,56 Bb
Sementes em sacos plásticos	30	15,2 ± 11,1 ABa	61,6 ± 9,21 BCb
	80	25,6 ± 10,0 Ba	76,0 ± 12,3 CDb
	130	4,8 ± 5,22 Aa	91,2 ± 7,69 Eb
Sementes nos frutos	30	14,4 ± 4,56 ABa	48,0 ± 9,38 Bb
	80	73,6 ± 9,63 Ca	83,2 ± 6,57 DEb
	130	16,8 ± 8,20 ABb	0,0 ± 0 Aa

^zMédia ± desvio padrão das porcentagens de germinação de 5 repetições de 25 sementes cada por tratamento. Letras maiúsculas iguais na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p≤0,05). Letras maiúsculas iguais na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste t de Student (p≤0,05).

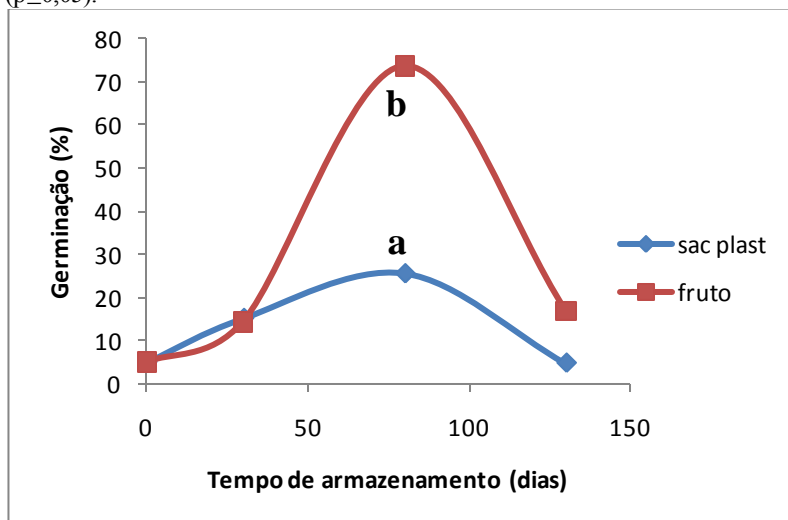
Esses resultados sugerem que, ambas as espécies pareceram requerer um período prolongado de exposição a 5°C, para que maiores taxas de germinação fossem alcançadas, independente do armazenamento em sacos plásticos ou da manutenção das sementes nos frutos, sugerindo a existência de um mecanismo de dormência, que parece ter sido quebrado pela exposição à baixa temperatura.

Verifica-se, também na Tabela 2, que, para *P. tenuifila* a melhor forma de armazenamento a 5°C foi mantendo-se as sementes nos frutos por 80 dias (73,6%), sendo que nessa condição permaneceram com alta viabilidade, mas com queda significativa na germinação após 130 dias de armazenamento. Já para *P. setacea* as sementes mantidas em sacos plásticos mostraram alta viabilidade (91,2%), aos 130 dias de armazenamento a 5°C, mas nos frutos a melhor porcentagem (83,2%) de germinação ocorreu, também, com 80 dias de armazenamento, da mesma forma que em *P. tenuifila*. Entretanto, as sementes mantidas nos frutos de *P. setacea* armazenados por 130 dias a 5°C não germinaram. Em todas as formas e períodos de armazenamento as sementes de *P. setacea* apresentaram porcentagens de germinação significativamente

maiores dos que as sementes de *P. tenuifila*, exceto no caso das sementes armazenadas nos frutos de *P. tenuifila*, que aos 130 dias de armazenamento ainda apresentaram 16,8% de germinação, enquanto que as sementes de *P. setacea*, nessa mesma condição de armazenamento, perderam totalmente a viabilidade.

A taxa de germinação das sementes de *P. tenuifila* armazenadas em sacos plásticos, por 30 dias, de 15,2%, foi estatisticamente semelhante à das sementes mantidas nos frutos por 30 dias (14,4%), não diferindo do controle (5,01%) e nem do valor obtido para sementes armazenadas por 80 dias (25,6%). O mesmo ocorreu com as sementes de *P. setacea* armazenadas por 30 dias em sacos plásticos, cuja germinação, de 61,6%, não diferiu estatisticamente da verificada para as sementes armazenadas nos frutos, por 30 dias (48,0%) e nem do controle, no tempo zero, no início do experimento (50,5%).

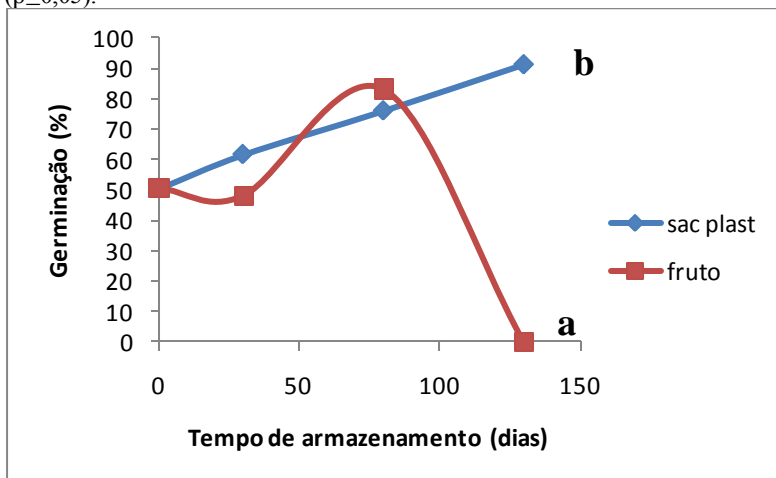
Figura 4. Relação entre taxa de germinação de sementes de *Passiflora tenuifila* e período de armazenamento a 5°C, nos frutos e em sacos plásticos. Valores são médias de 5 repetições de 25 sementes por tratamento. As letras comparam os tratamentos no período de armazenamento de 80 dias pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).



Os padrões diferentes de variação dos gráficos das taxas de germinação em função do período e do tipo de armazenamento das sementes são apresentados na Figura 4 para *P. tenuifila* e na Figura 5 para *P. setacea*. Verifica-se a semelhança entre os padrões das curvas de

germinação das sementes mantidas nos frutos, de ambas as espécies, no que se refere à queda nas taxas de germinação, a partir de 80 dias de armazenamento dos frutos a 5°C. Observa-se, também, as diferenças entre os padrões das curvas de germinação das sementes armazenadas em sacos plásticos, a partir de 80 dias de armazenamento, com a queda da germinação em *P. tenuifila* e com a manutenção de altas taxas de germinação em *P. setacea*.

Figura 5. Relação entre taxa de germinação de sementes de *Passiflora setacea* e período de armazenamento a 5°C, nos frutos e em sacos plásticos. Valores são médias de 5 repetições de 25 sementes por tratamento. As letras compararam os tratamentos no período de armazenamento de 130 dias pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

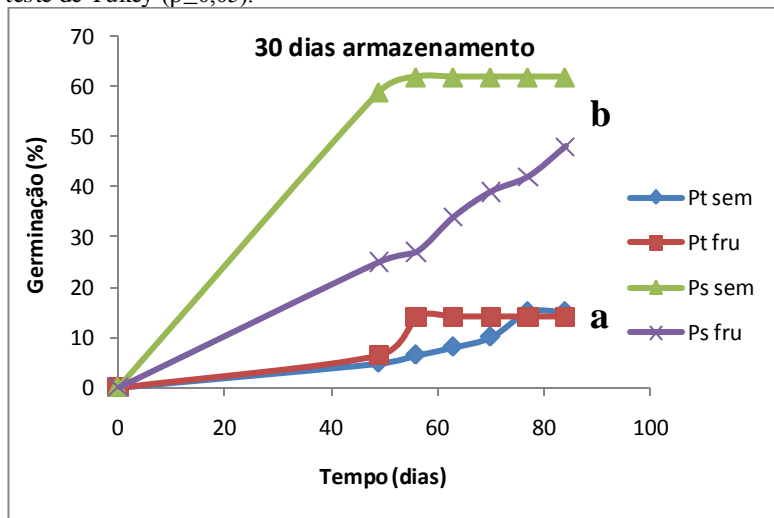


As Figuras 6, 7 e 8 apresentam os gráficos que relacionam as taxas de germinação, em função do tempo de avaliação dos experimentos, das sementes de ambas as espécies, submetidas ao armazenamento a 5°C, em sacos plásticos ou mantidas nos frutos, por 30, 80 e 130 dias. A análise dos gráficos de germinação em função do tempo é importante, pois fornece informações sobre os padrões de curvas de germinação obtidas, bem como os momentos em que foram atingidas as porcentagens máximas de germinação, em cada tratamento, e a partir de que momento as porcentagens de germinação estabilizaram.

Na Figura 6 estão representados os gráficos da germinação, em função do tempo, das sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea*, armazenadas a 5°C, por 30 dias, em sacos plásticos ou mantidas nos frutos. Apesar de

não terem sido calculados os Índices de Velocidade de Germinação para os experimentos, é possível verificar que a germinação das sementes de *P. setacea* armazenadas em sacos plásticos foi mais rápida do que nos demais tratamentos, alcançando mais de 50%, já aos 40 dias do início do experimento, estabilizando entre 50 e 60 dias. Nos demais tratamentos, principalmente no caso das sementes de *P. tenuifila*, em ambas as formas de armazenamento, a germinação foi mais lenta, estabilizando após 50 dias do início do experimento, mesmo no caso das sementes de *P. setacea* armazenadas nos frutos.

Figura 6. Germinação de sementes de *Passiflora tenuifila* (Pt) e *Passiflora setacea* (Ps) submetidas a 30 dias de armazenamento a 5°C em sacos plásticos (sem) ou nos frutos (fru). Valores são médias de 5 repetições com 25 sementes cada. As letras compararam os tratamentos no tempo de avaliação de 84 dias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Mas, após 80 dias de armazenamento observa-se, na Figura 7, que houve uma alteração nos padrões das curvas de germinação das sementes, em relação aos padrões observados na Figura 6 (aos 30 dias de armazenamento). Verifica-se que, exceto no caso das sementes de *P. tenuifila* armazenadas em sacos plásticos, 50% da germinação já foi alcançada antes dos 40 dias do início do experimento, ao redor dos 30 dias, o que indica um aumento da velocidade de germinação das sementes em relação ao período de 30 dias de armazenamento. Assim, verifica-se que já aos 25 dias do início do experimento as taxas de germinação nos três melhores tratamentos variaram entre 68% e 79% e a

germinação pareceu estabilizar entre 25 e 32 dias a partir do início do experimento. A exceção ao padrão foi a curva de germinação obtida para as sementes de *P. tenuifila* armazenadas em sacos plásticos, que germinaram mais lentamente e bem menos do que nos demais tratamentos.

Aos 130 dias de armazenamento a 5°C (Figura 8) observa-se, novamente uma alteração nos padrões das curvas de germinação, em relação às curvas da Figura 7, exceto para as sementes de *P. setacea* armazenadas em sacos plásticos, que mantiveram um padrão semelhante aos períodos de 30 e de 80 dias de armazenamento, alcançando 72,8% de germinação já aos 25 dias do início do experimento, enquanto que em todos os outros tratamentos as taxas de germinação foram abaixo de 20% e as curvas de germinação sugerem que as sementes germinaram muito lentamente, ao mesmo tempo em que ocorreu a queda significativa na viabilidade.

Quando se analisa, de modo geral, os teores de água das sementes em relação às porcentagens de germinação nos mesmos períodos e condições de armazenamento, verifica-se que, para *P. setacea*, os tratamentos que apresentaram maiores taxas de germinação ocorreram tanto com as sementes contendo até 8,4% de água como 23,21% de água, parecendo independe do teor de água. O mesmo foi constatado para *P. tenuifila*, em que a maior hidratação das sementes aos 80 e 130 dias de armazenamento nos frutos não necessariamente contribuiu para estimular a germinação das sementes nesses dois períodos. Porém, os valores de correlação simples, calculados separadamente para cada condição de armazenamento das sementes, para ambas as espécies, indicaram conclusões diferentes, como descrito a seguir.

Os coeficientes de correlação simples (r) foram calculados para verificar o grau de associação linear entre as variáveis (a) teor de água das sementes e (b) germinação, nos diferentes tempos de armazenamento das sementes. Verifica-se, na Tabela 3, que para as sementes de *P. tenuifila* houve baixa correlação linear positiva entre o teor de água e as taxas de germinação (valores de r de 0,26 e 0,09), tanto quando as sementes foram armazenadas em sacos plásticos ou mantidas nos frutos.

Já para as sementes de *P. setacea* armazenadas em sacos plásticos, o valor de r foi de -0,97 e significativo a 5% de probabilidade, indicando que o aumento na taxa de germinação apresentou forte correlação linear com a diminuição no teor de água das sementes. Porém, no caso das sementes mantidas nos frutos, o valor de r foi 0,59, indicando média correlação linear entre as variáveis teor de água das

Figura 7. Germinação de sementes de *Passiflora tenuiflora* (Pt) e *Passiflora setacea* (Ps) submetidas a 80 dias de armazenamento a 5°C em sacos plásticos (sem) ou nos frutos (fru). Valores são médias de 5 repetições com 25 sementes cada. As letras comparam os tratamentos no tempo de avaliação de 67 dias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

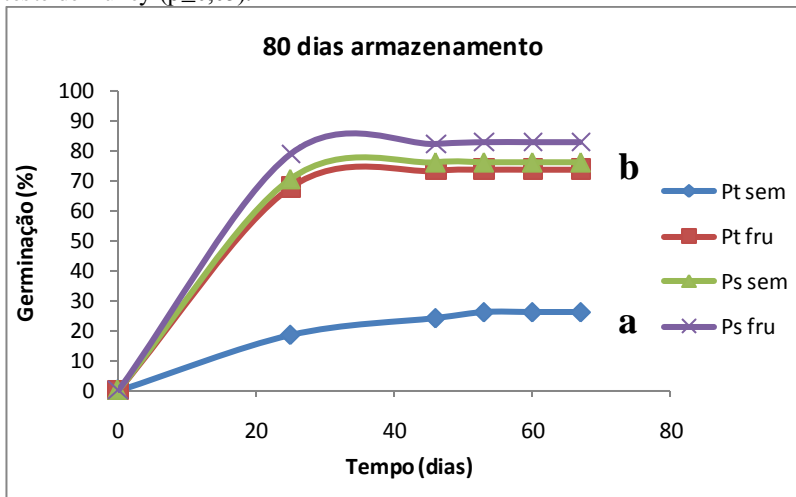
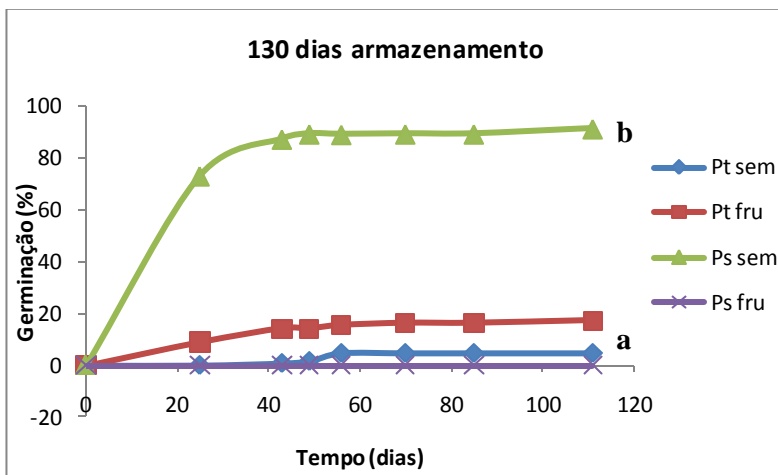


Figura 8. Germinação de sementes de *Passiflora tenuiflora* (Pt) e *Passiflora setacea* (Ps) submetidas a 130 dias de armazenamento a 5°C em sacos plásticos (sem) ou nos frutos (fru). Valores são médias de 5 repetições com 25 sementes cada. As letras comparam os tratamentos no tempo de avaliação de 111 dias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



sementes e taxas de germinação, nos diferentes tempos de armazenamento.

Tabela 3. Coeficientes de correlação simples (r) entre os teores de água e taxas de germinação das sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea* não armazenadas ou armazenadas por 30, 80 e 130 dias a 5°C.

Tipo de Armazenamento	<i>P. tenuifila</i>	<i>P. setacea</i>
Sacos plásticos	0,26	-0,97
Frutos	0,09	0,59

Os resultados indicam que as maiores porcentagens de germinação das sementes de *P. tenuifila* a 5°C foram garantidas através do armazenamento dos frutos frescos, mas por 80 dias somente, enquanto que para *P. setacea* o armazenamento dos frutos, por 80 dias e das sementes, em sacos plásticos, por até 130 dias, permitiram a manutenção das maiores porcentagens de germinação, sendo que nas sementes mantidas em sacos plásticos, a porcentagem de germinação aumentou com a diminuição do teor de água das sementes.

O efeito promotor da exposição a 5°C na germinação estimulou a realização dos experimentos a seguir, para verificar o efeito da embebição em ácido giberélico na germinação, já que as giberelinas podem promover a germinação, substituindo a necessidade da exposição à baixa temperatura, no caso das sementes que necessitam desse tratamento.

4.1.2. Efeito de ácido giberélico e 6-benzilaminopurina na germinação das sementes de *P. tenuifila*

Para testar se reguladores de crescimento poderiam substituir a necessidade do tratamento de baixa temperatura e otimizar a germinação foram então realizados os experimentos com ácido giberélico, em que as sementes, após serem removidas dos frutos frescos recém coletados, foram embebidas nesse hormônio, antes de serem colocadas para germinar em solo, em casa de vegetação.

Também foi testado o efeito de uma citocinina (BAP) isoladamente e a aplicação simultânea de ácido giberélico (GA₃) e BAP, uma vez que na fórmula da promalina, composto utilizado na promoção da germinação de sementes de certas espécies de maracujás, aparecem duas giberelinas e a 6-benziladenina (ou 6-benzilaminopurina) como ingredientes ativos (1,88% de GA₄ e GA₇ + 1,88% de BAP).

Nesses experimentos as sementes foram removidas dos frutos maduros frescos, tiveram os arilos removidos e foram utilizadas em seguida para a determinação do teor de água ou submetidas à embebição, por 1 e 5 dias, em água e em soluções aquosas de diferentes concentrações (0, 0,31%; 0,62%; 1,25% e 2,5%, correspondentes, respectivamente, a 9,03 mM, 18,06 mM, 36,12 mM e 72,25 mM de GA e de 13,88 mM, 27,77 mM, 55,55 mM e 111,11 mM de BAP) dos reguladores de crescimento GA e BAP, isoladamente ou em combinação e depois foram colocadas para germinar em solo, na casa de vegetação.

Devido a não disponibilidade de sementes de *P. setacea*, esses experimentos foram realizados apenas com as sementes de *P. tenuifila*.

Na Tabela 4 estão expressos os valores do teor de água das sementes utilizadas nesses experimentos, logo após a remoção dos frutos frescos. O teor de água das sementes utilizadas nesses experimentos foi de 12,73%, valor similar ao do controle utilizado no experimento anterior, de 11,05%.

Tabela 4. Teor de água de sementes de *Passiflora tenuifila* removidas dos frutos maduros imediatamente após a coleta.

Experimentos	Teor de água (%MF)
1	14,4 ± 2,50
2	12,7 ± 1,57
3	12,6 ± 1,31
Média±DP	12,7 ± 1,79

Valores são médias ± desvio padrão de 4 repetições de 20 sementes cada.

Nas Tabelas 5, 6 e 7 estão expressas as máximas porcentagens de germinação observadas nos tratamentos com GA, BAP e GA+BAP.

Nos resultados dos tratamentos com GA, expressos na Tabela 5 observam-se que, com 1 dia de embebição não houve diferença entre os tratamentos, com as taxas de germinação variando de 36% a 52,8%. Entretanto, a embebição por 5 dias em ácido giberélico, promoveu, significativamente, a maior taxa de germinação quando comparado aos outros tratamentos, sendo que a maior porcentagem de germinação (79%) foi observada com a embebição prévia das sementes com ácido giberélico a 2,5%, por 5 dias, a 25°C. Verifica-se também, que, apenas no tratamento com 2,5% de ácido giberélico o tempo de embebição de 5 dias foi superior ao tempo de embebição de 1 dia. Nos demais tratamentos não houve influência dos tempos de embebição sobre a germinação.

Nesse experimento não houve diferença entre as taxas de germinação das sementes não embebidas ou embebidas em água, por 1 ou 5 dias.

Tabela 5. Efeito do ácido giberélico e do tempo de embebição sobre a germinação de sementes de *Passiflora tenuifila* aos 77 dias (1 dia de embebição) e 73 dias (5 dias de embebição) a partir do início do experimento.

Tratamentos	Tempos de embebição (dias)	
	1	5
0 GA (sem embebição)	52,8 \pm 5,9 Aa	59,3 \pm 12,0 Aa
0 (embebição água)	46,4 \pm 6,7 Aa	54,4 \pm 5,4 Aa
0,31% GA	48,0 \pm 11,7 Aa	55,2 \pm 13,1 Aa
0,62% GA	39,2 \pm 12,5 Aa	46,4 \pm 18,9 Aa
1,25% GA	46,4 \pm 9,6 Aa	40,8 \pm 12,5 Aa
2,50% GA	36,0 \pm 12,6 Aa	79,2 \pm 10,0 Bb

Médias \pm desvio padrão de 5 repetições 25 sementes cada seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, pelos testes t de Student e de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas, na coluna, comparam as concentrações de ácido giberélico; letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de embebição.

Os padrões diferentes de variação dos gráficos das taxas de germinação em função das concentrações de GA utilizadas na embebição, por 1 e 5 dias, de sementes de *P. tenuifila* são apresentados na Figura 9. Constatou-se o efeito promotor crescente da embebição em GA, por 5 dias, a partir da concentração de 1,25%, em relação aos tratamentos com 1 dia de embebição, em que as diferentes concentrações de GA não tiveram efeito na germinação.

Nos tratamentos com BAP, expressos na Tabela 6, observa-se que, com 1 dia de embebição houve diferença entre os tratamentos, sendo que a maior porcentagem de germinação ocorreu no tratamento com embebição em água (49,6%), mas esse tratamento não diferiu significativamente dos tratamentos de embebição em 0,62% e 2,5%, em que as taxas de germinação foram respectivamente de 33,6% e 36,8%. A embebição por 5 dias em BAP inibiu a germinação das sementes, em todos os tratamentos, em relação ao tratamento sem embebição, sendo que as taxas de germinação observadas variaram entre 2,4% (com 2,5% de BAP) e 10,4% (com 0,31% de BAP).

Nos tratamentos com 0,62% e 2,5% de BAP o tempo de embebição das sementes por 5 dias inibiu a germinação em relação ao tempo de embebição de 1 dia.

Figura 9. Relação entre taxa de germinação de sementes de *Passiflora tenuiflora* e concentrações de GA utilizadas na embebição por 1 dia e 5 dias. Valores são médias de 5 repetições de 25 sementes por tratamento. As letras comparam os tratamentos na concentração de 2,5% pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

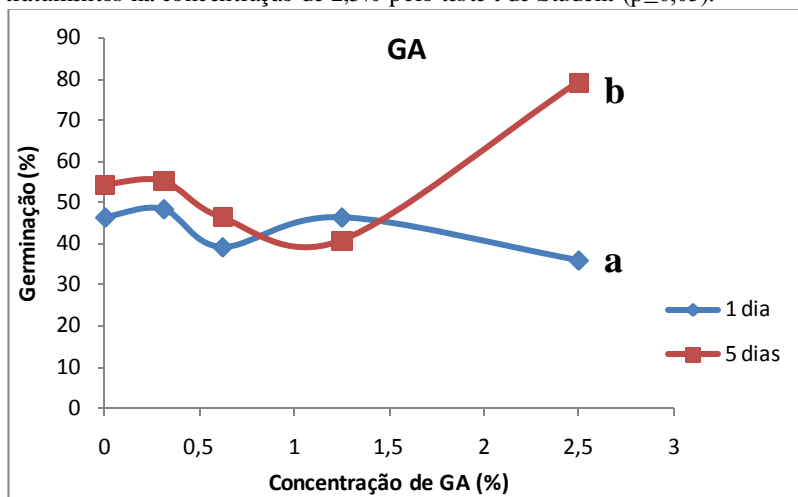


Tabela 6. Efeito da 6-benzilaminopurina e do tempo de embebição sobre a germinação de sementes de *Passiflora tenuiflora* aos 112 dias (1 dia de embebição) e 105 dias (5 dias de embebição) a partir do início do experimento.

Tratamentos	Tempos de embebição (dias)	
	1	5
0 BAP (sem embebição)	12,8 \pm 5,2 Aa	12,0 \pm 6,8 Ba
0 BAP (embebição água)	49,6 \pm 9,2 Bb	39,2 \pm 2,3 Ca
0,31% BAP	17,6 \pm 5,4 Aa	10,4 \pm 6,8 ABa
0,62% BAP	33,6 \pm 15,6 Bb	3,20 \pm 6,0 ABa
1,25% BAP	10,4 \pm 4,6 Aa	7,20 \pm 8,6 ABa
2,50% BAP	36,8 \pm 9,1 Bb	2,40 \pm 3,8 Aa

Médias \pm desvio padrão de 5 repetições de 25 sementes cada seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, pelos testes t de Student e de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas, na coluna, comparam as concentrações de 6-benzilaminopurina; letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de embebição.

Nesse experimento houve diferença entre as taxas de germinação das sementes não embebidas ou embebidas em água, por 1 ou 5 dias, sendo a germinação maior nas sementes embebidas em água, independente do tempo de embebição.

Os padrões diferentes de variação dos gráficos das taxas de germinação em função das concentrações de BAP utilizadas na embebição, por 1 e 5 dias, de sementes de *P. tenuifila* são apresentados na Figura 10. Observa-se o efeito promotor crescente da embebição em BAP por 1 dia, a partir da concentração de 1,25% em relação aos tratamentos com 5 dias de embebição, em que houve a queda drástica na germinação já na concentração de 0,31% de BAP.

Nos tratamentos em que GA e BAP foram utilizados simultaneamente, expressos na Tabela 7, com 1 dia de embebição o tratamento com 0,31% de GA + 0,31% de BAP promoveu a germinação das sementes (32%) em relação ao tratamento com 1,25% de GA + 1,25% de BAP, mas com 5 dias de embebição, os tratamentos de 0,62% de GA + 0,62% de BAP e de 1,25% de GA + 1,25% de BAP inibiram significativamente a germinação em relação aos demais tratamentos. Apenas no tratamento com 0,62% de GA + 0,62% de BAP, o tempo de embebição de 5 dias inibiu a germinação das sementes. Nos demais tratamentos, não houve diferença entre os tempos de embebição. Nesse experimento, não houve diferença entre as taxas de germinação das sementes não embebidas ou embebidas em água, por 1 ou 5 dias.

Tabela 7. Efeito de ácido giberélico e de 6-benzilaminopurina e do tempo de embebição sobre a germinação de sementes de *Passiflora tenuifila* aos 112 dias (1 dia de embebição) e 105 dias (5 dias de embebição) a partir do início do experimento.

Tratamentos	Tempos de embebição (dias)	
	1	5
0 GA+BAP (sem embebição)	21,6 ±10,0 ABa	21,6 ±10,0 Ba
0 GA+BAP (embebição água)	19,2 ±4,4 ABa	30,4 ±10,0 Ba
0,31% GA + 0,31% BAP	32,0 ±10,2 Ba	28,8 ±4,4 Ba
0,62% GA + 0,62% BAP	18,4 ±6,1 ABb	1,60 ±2,2 Aa
1,25% GA + 1,25% BAP	14,4 ±12,8 Aa	8,00 ±6,3 Aa

Médias ± desvio padrão de 5 repetições de 25 sementes cada seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, pelos testes t de Student e de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas, na coluna, comparam as concentrações de ácido giberélico+6-benzilaminopurina; letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de embebição.

Os padrões diferentes de variação dos gráficos das taxas de germinação em função das concentrações de BAP+GA utilizadas na embebição por 1 e 5 dias de sementes de *P. tenuifila* são apresentados na Figura 11. Observa-se o efeito promotor crescente da embebição em

Figura 10. Relação entre taxa de germinação de sementes de *Passiflora tenuifolia* e concentrações de BAP utilizadas na embebição por 1 dia e 5 dias. Valores são médias de 5 repetições de 25 sementes por tratamento. As letras comparam os tratamentos na concentração de 2,5% pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

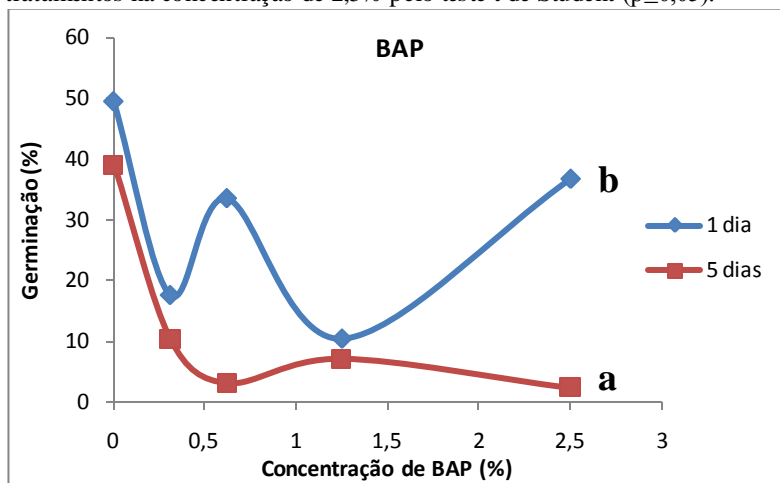
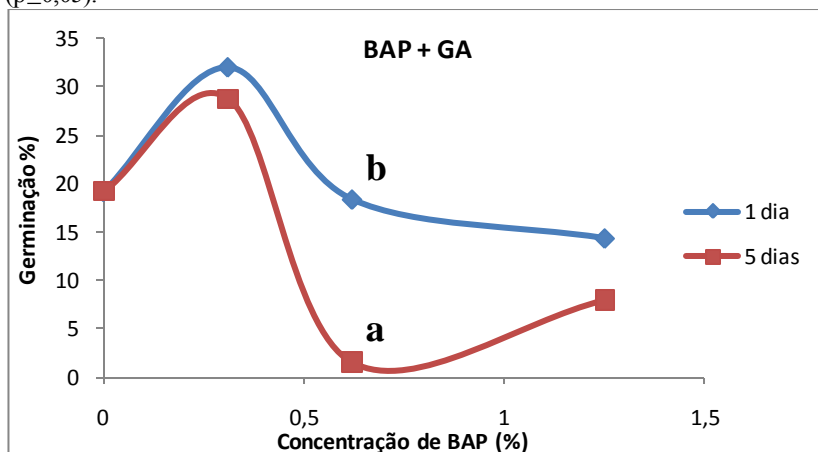


Figura 11. Relação entre taxa de germinação de sementes de *Passiflora tenuifolia* e concentrações de BAP+GA utilizadas na embebição por 1 dia e 5 dias. Valores são médias de 5 repetições de 25 sementes por tratamento. As letras comparam os tratamentos na concentração de 0,31% pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).



BAP por 1 dia e 5 dias, até a concentração de 1,25% e o efeito inibitório da germinação, na embebição por 5 dias em relação aos tratamentos com 1 dia de embebição.

Nas Figuras 12, 13 e 14 são mostradas as curvas de germinação em função do tempo de avaliação, respectivamente, para cada tratamento: GA, BAP e BAP+GA.

Figura 12. Germinação em função do tempo de sementes de *P. tenuiflora* não embebidas ou previamente embebidas por 1 e 5 dias em água ou soluções de ácido giberélico (GA) de 0,31%, 0,62%, 1,25% e 2,5%. Os valores são médias de 5 repetições de 25 sementes cada. As letras compararam os tratamentos entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

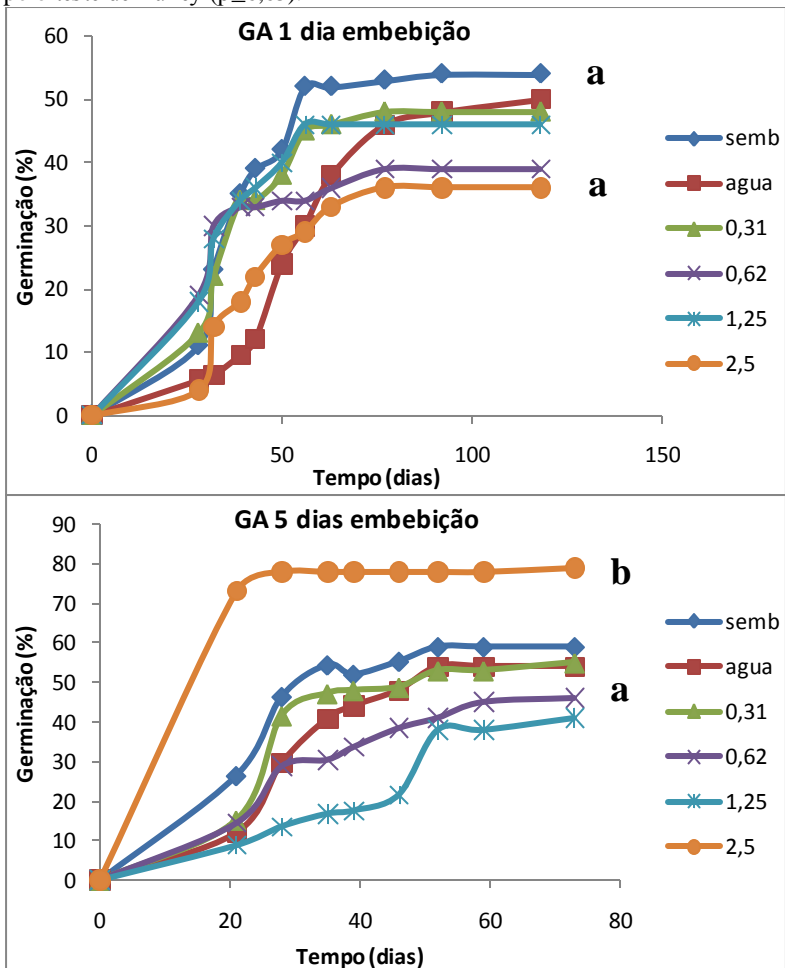


Figura 13. Germinação em função do tempo de sementes de *P. tenuifila* não embebidas ou previamente embebidas por 1 e 5 dias em água ou soluções de 6-benzilaminopurina (BAP) de 0,31%, 0,62%, 1,25% e 2,5%. Os valores são médias de 5 repetições de 25 sementes cada. As letras compararam os tratamentos entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

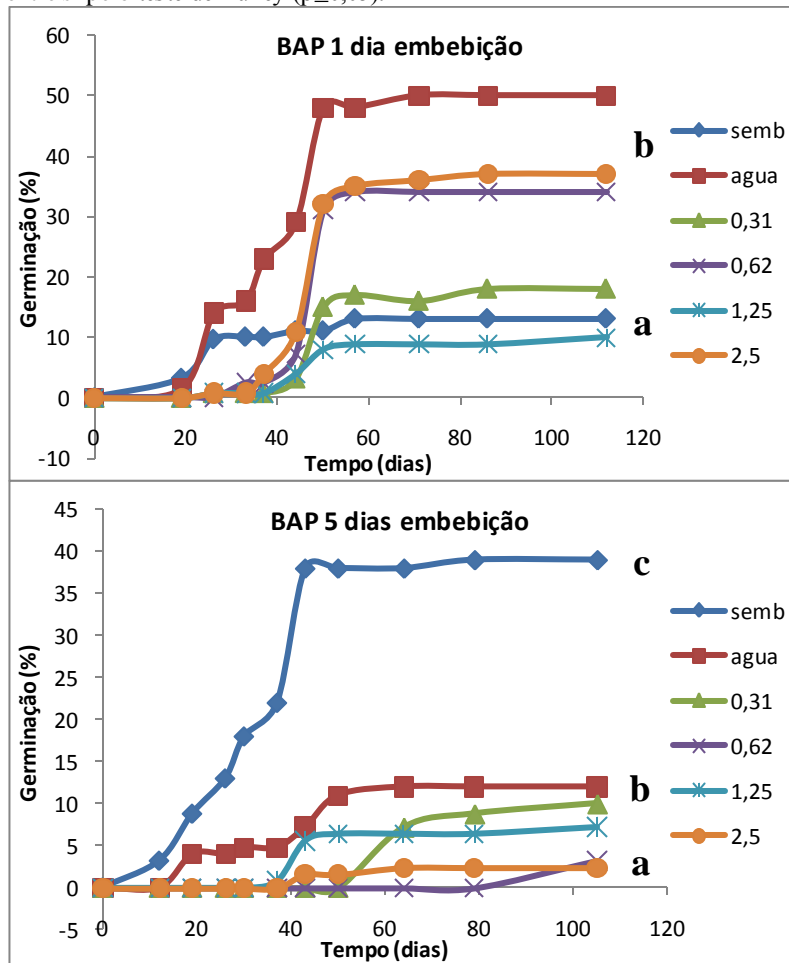
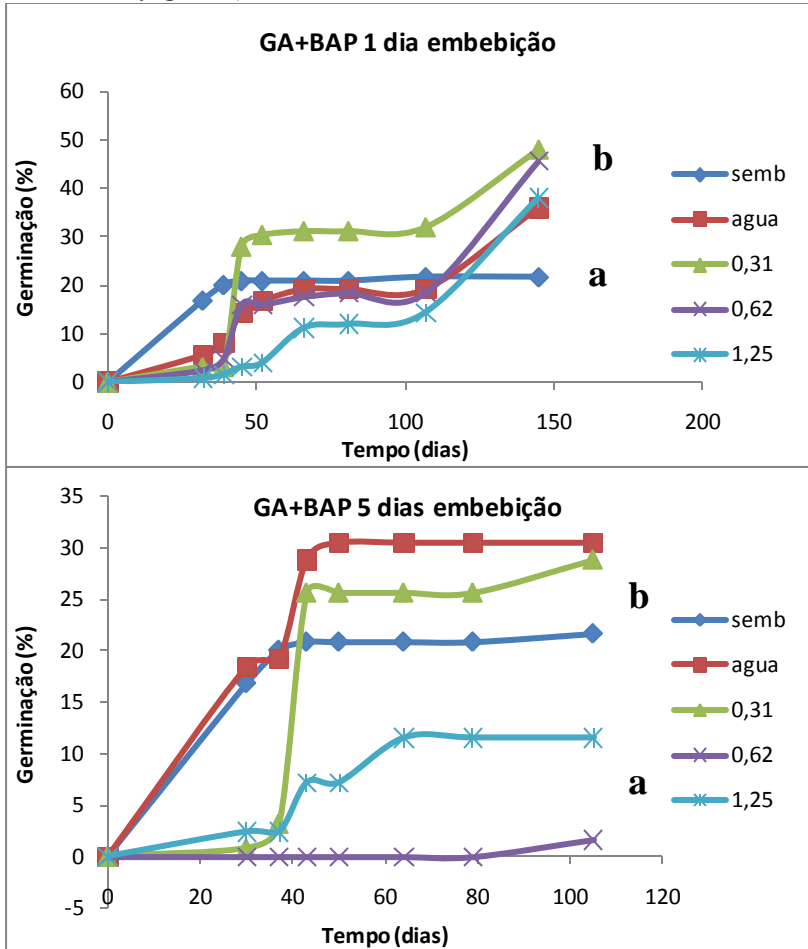


Figura 14. Germinação em função do tempo de sementes de *P. tenuiflora* não embebidas ou previamente embebidas por 1 e 5 dias em água ou soluções de 6-benzilaminopurina (BAP) de 0,31%, 0,62%, 1,25% em combinação com soluções de mesmas concentrações de GA. Os valores são médias de 5 repetições de 25 sementes cada. As letras compararam os tratamentos entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Para o GA (Figura 12), as taxas máximas de germinação, com 1 dia de embebição, foram alcançadas, em todos os tratamentos, após 50 dias do início dos experimentos, quando tenderam a estabilizar. Porém, com 5 dias de embebição verifica-se que, no tratamento com 2,5% de GA, a taxa máxima de germinação (79%) foi alcançada já aos 20-30

dias do início do experimento, o que indica que o GA a 2,5% agiu aumentando, também, a velocidade de germinação e fazendo com que uma porcentagem maior de sementes germinassem em relação aos demais tratamentos.

Para o BAP (Figura 13), verifica-se que a embebição em água por 1 e 5 dias as taxas máximas de germinação (50% e 30%, respectivamente com 1 dia e 5 dias de embebição) foram alcançadas ao redor dos 40 dias do início do experimento, estabilizando-se a partir desse período. Assim, a embebição em água aumentou a velocidade de germinação das sementes e também as porcentagens de germinação em relação aos tratamentos com BAP.

Para o tratamento GA+BAP (Figura 14), no tratamento de embebição em água por 1 e 5 dias as taxas máximas de germinação (20% e 30%, respectivamente com 1 dia e 5 dias de embebição) foram alcançadas ao redor dos 50 dias do início do experimento, estabilizando-se a partir desse período, da mesma forma que os melhores resultados de embebição em 0,31% de BAP. Assim, nos tratamentos com GA + BAP houve redução da velocidade de germinação das sementes e também as porcentagens de germinação em relação aos tratamentos em que as sementes não foram embebidas ou foram embebidas em água.

As taxas de germinação das sementes não embebidas ou embebidas em água, nos diferentes experimentos foram muito variáveis (de 12% a 59,3% considerando todos os controles sem embebição e com embebição dos experimentos com GA, BAP e BAP+GA). Em apenas um experimento a embebição em água, por 1 e 5 dias, promoveu a germinação em relação às sementes não embebidas, o que mostra que a necessidade por embebição variou, por alguma razão, entre as sementes do controle. Mas, mesmo assim, a máxima porcentagem de germinação alcançada pelas sementes do controle foi de 59,3%.

Os resultados indicam que o melhor tratamento para induzir a germinação das sementes foi a embebição em solução de 2,5% de GA, por 5 dias (79,2%), antes de serem colocadas para germinar em solo. Indicam também que a embebição em BAP, por 1 e 5 dias não teve efeito promotor na germinação das sementes, como o GA, inibindo a germinação em vários tratamentos ou não influenciando sobre o processo, sendo o maior valor, de 36,8% de germinação, observado nos tratamentos com BAP 2,5%, com 1 dia de embebição. A embebição em BAP+GA, por 1 e 5 dias não teve efeito promotor na germinação das sementes, quando comparado com GA utilizado isoladamente, inibindo e retardando a germinação em relação aos controles, em vários

tratamentos, sendo o maior valor, de 32,0% de germinação, observado no tratamento com BAP 0,31% + GA 0,31%, com 1 dia de embebição.

Os experimentos foram montados em março de 2013 e a germinação monitorada para os todos os tratamentos até junho/julho de 2013. Nos experimentos com BAP, em alguns tratamentos, o monitoramento da germinação foi prolongado com avaliações em julho, agosto e início de setembro (por seis meses), indicando um aumento acentuado na germinação, após a fase de estabilização (entre julho e setembro), mas mesmo assim o máximo da germinação alcançada foi inferior a 50%. Esses dados indicam que alterações nas amplitudes de variação das temperaturas mínimas e máximas na casa de vegetação, com a aproximação da primavera, possam ter sido responsáveis pelo estímulo da germinação observada posteriormente.

4.1.3. Efeito do armazenamento dos frutos ao ar livre a 25°C na germinação das sementes de *P. tenuifila*

Os experimentos descritos a seguir tiveram como objetivo avaliar a viabilidade das sementes, quando os frutos foram mantidos desidratando ao ar livre, a 25°C. Foram realizados dois experimentos.

No experimento 1, os frutos frescos recém coletados foram armazenados em caixas de papelão, por 10 meses, sem sobreposição e deixados para desidratar em temperatura ambiente e UR ao redor de 70% (exceto na sexta semana em que predominaram as chuvas) em caixas de papelão. Nesse experimento os frutos foram coletados em junho de 2014. Os frutos foram pesados semanalmente, durante as 10 primeiras semanas de armazenamento para a determinação dos valores de redução em massa fresca e do teor de água perdida, em porcentagem.

Na Figura 15 estão representados, para cada fruto analisado, os gráficos da redução em massa fresca dos mesmos, durante o decorrer das 10 semanas de armazenamento. Alguns dos frutos chegaram a perder quase 50% de suas massas frescas na primeira semana, sendo a redução posterior em massa fresca atenuada, estabilizando-se pela quarta ou quinta semana de armazenamento.

Na Tabela 8 estão os valores das médias do teor de água perdida pelos frutos durante o decorrer do armazenamento. Já na primeira semana o teor de água perdida pelos frutos foi de 58,82% chegando a 72,08% na décima semana de armazenamento.

Figura 15. Efeito do tempo de desidratação ao ar livre a 25°C sobre a redução nas massas frescas (g) dos frutos (30 frutos) de *P. tenuifila* analisados individualmente durante o decorrer do período de armazenamento.

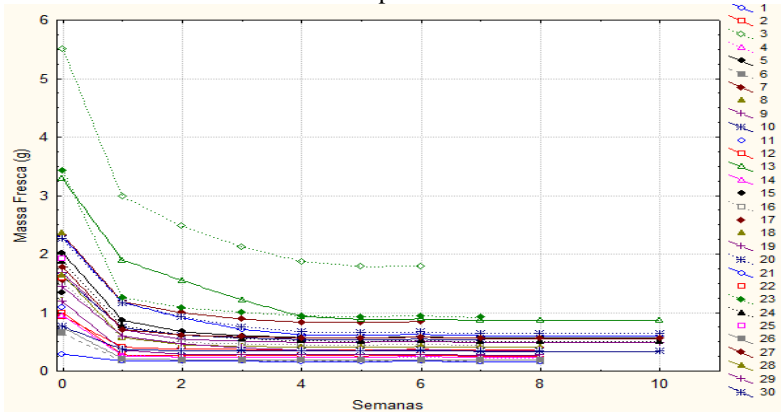


Tabela 8. Teor de água perdida pelos frutos de *P. tenuifila* no decorrer de 10 semanas de armazenamento ao ar livre, a 25°C e UR de 70%.

Teorde água perdida (%) ^z	Tempo de armazenamento (semanas)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	10
Média	58,8	64,9	67,5	69,4	69,7	69,0	70,5	70,4	72,1
DP	10,1	8,7	7,8	7,6	7,6	7,9	7,8	8,4	1,9
Nº de frutos	23	23	23	23	23	23	21	19	7

^zMédia, desvio padrão e número de frutos indicados na tabela.

Na Figura 16 estão representados os gráficos que mostram padrões de variação da perda d’água pelos frutos, em porcentagem, em função do tempo de armazenamento. Constata-se que a maioria dos frutos apresentou o mesmo padrão de perda de água, mais intensa, nas primeiras semanas de armazenamento, estabilizando-se entre 2-4 semanas, ao redor de 70%. Alguns frutos desidrataram rapidamente durante a primeira semana, enquanto em outros a desidratação foi mais lenta, estabilizando a perda na quarta semana de armazenamento.

Os teores de água das sementes dos frutos frescos, no tempo zero, no início do experimento e após 1,5; 7 e 10 meses de armazenamento dos frutos ao ar livre a 25°C são mostrados na Tabela 9. O teor de água das sementes removidas dos frutos frescos, recém coletados, no início

do experimento, foi de 11,44% e diminuiu significativamente, após os respectivos períodos de armazenamento, para valores que variaram entre 8,38 e 9,61%, e que não diferiram estatisticamente entre si. Portanto, não houve diferença entre o teor de umidade das sementes de frutos armazenados por 45 dias e 10 meses, permanecendo constante, após 45 dias de armazenamento. Assim como o teor de água dos frutos, as sementes também tiveram uma redução em seus teores de água com o decorrer do tempo de armazenamento dos frutos.

Figura 16. Efeito do tempo de desidratação ao ar livre a 25°C sobre o teor de água (%) perdida pelos frutos (30 frutos) de *P. tenuifila* analisados individualmente durante o decorrer do período de armazenamento.

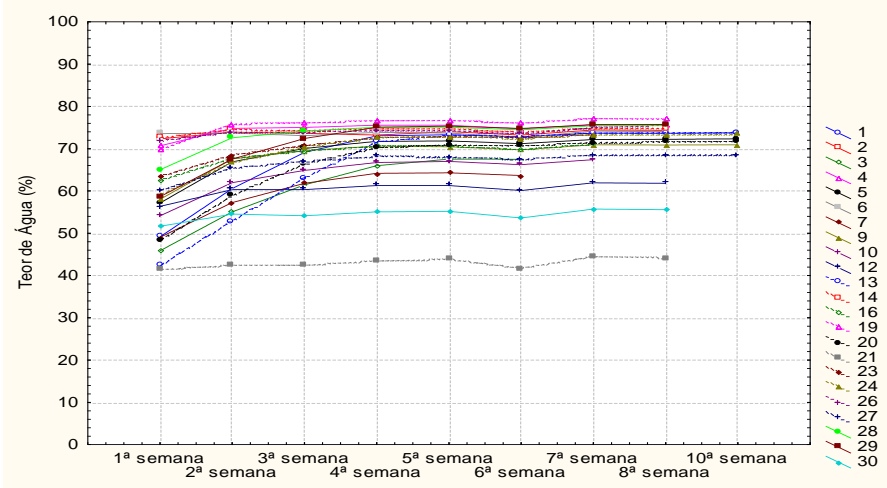


Tabela 9. Efeito do armazenamento dos frutos de *Passiflora tenuifila* ao ar livre a 25°C sobre o teor de água das sementes.

Tempo de armazenamento (meses)	Teor de Água (%) ^z
0	11,44 ± 1,67 b
1,5	8,83 ± 0,73 a
7	8,38 ± 1,46 a
10	9,61 ± 0,78 a

^zMédia ± desvio padrão do teor de água das sementes de 4 repetições de 15 sementes cada, por tratamento. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os experimentos de germinação foram realizados em três momentos: logo quando os frutos foram colhidos (tempo zero) e após 45 dias, 7 meses e 10 meses de armazenamento dos mesmos.

Nestes experimentos as sementes foram removidas dos frutos, tiveram os arilos removidos e imediatamente imersas, por 5 dias, em solução de ácido giberélico 2,5% antes de serem colocadas para germinar, em condições controladas, a 25°C.

Na Tabela 10 são mostradas as porcentagens de germinação máximas das sementes, aos 65 dias do início do experimento. As porcentagens de germinação das sementes dos frutos que ficaram armazenados por 45 dias (91,66%) e por 7 meses (85,77%) não diferiram significativamente do controle, realizado no início do experimento com as sementes removidas dos frutos frescos, recém coletados (80,61%). Contudo, esses valores diferiram do tratamento de 10 meses de armazenamento (27,14%), indicando a queda na viabilidade das sementes.

Tabela 10. Efeito do armazenamento dos frutos de *Passiflora tenuifila* ao ar livre a 25°C sobre a germinação (%). Dados aos 65 dias do início do experimento.

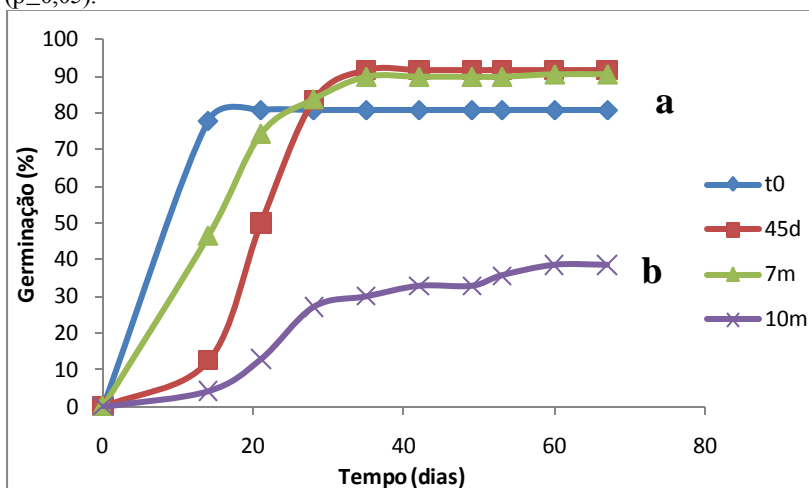
Tempo armazenamento (meses)	Germinação (%)
0	80,6 ± 2,8 b
1,5	91,7 ± 11,8 b
7	90,6 ± 4,4 b
10	27,1 ± 9,3 a

^aMédia ± desvio padrão das porcentagens de germinação. Para o tratamento no tempo zero (controle) foram utilizadas de 4-5 repetições com 14 – 30 sementes cada, dependendo do experimento. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As curvas de germinação das sementes, em função do tempo de avaliação do experimento, dos tratamentos de armazenamento por 0, 45 dias, 7 meses e 10 meses de frutos ao ar livre, a 25°C são mostradas na Figura 17. Os resultados indicam que os padrões das curvas de germinação das sementes de frutos com 0 e 7 meses de armazenamento foram semelhantes, sendo que as porcentagens máximas de germinação foram alcançadas antes dos 20 dias do início do experimento (tratamento do controle, tempo zero de armazenamento) ou, entre 20 e 40 dias do início do experimento, para as sementes de frutos que ficaram

armazenados por 45 dias e 7 meses. Para o experimento de 10 meses de armazenamento, contudo, os resultados indicam uma possível alteração no padrão da curva de germinação, sugerindo velocidade mais lenta de germinação já nos primeiros 30 dias de avaliação.

Figura 17. Germinação em função do tempo de sementes de frutos de *P. tenuifila* não armazenados (tempo zero no início do experimento, t0) ou submetidos por 45 dias (45d), 7 meses (7m) e 10 meses (10m) de armazenamento ar livre, a 25°C. Os valores são médias de 4-5 repetições com 14 – 30 sementes cada, dependendo do experimento. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Um segundo experimento foi realizado em Agosto/2014, seguindo-se a mesma metodologia de secagem dos frutos ao ar livre, a 25°C realizada no experimento 1, para confirmar os resultados obtidos.

Na Figura 18 estão representados, para cada fruto analisado, os gráficos da redução em massa fresca dos mesmos, durante o decorrer das 20 semanas de armazenamento. Os frutos chegaram a perder ao redor de 50% ou mais de suas massas frescas nas cinco primeiras semanas de armazenamento, estabilizando-se após a quinta ou sexta semana de armazenamento, resultados semelhantes aos observados no experimento 1.

Na Tabela 11 estão os valores das médias do teor de água perdida pelos frutos durante o decorrer do armazenamento. Verifica-se que, na segunda semana o teor de água perdido pelos frutos foi de 39,3%,

chegando a 70%, na décima semana de armazenamento e 71%, após 19 semanas, valores semelhantes aos obtidos no experimento 1, para 10 semanas de armazenamento.

Figura 18. Efeito do tempo de desidratação ao ar livre a 25°C sobre a redução nas massas frescas (mg) dos frutos (32 frutos) de *P. tenuifila* analisados individualmente durante o decorrer do período de armazenamento.

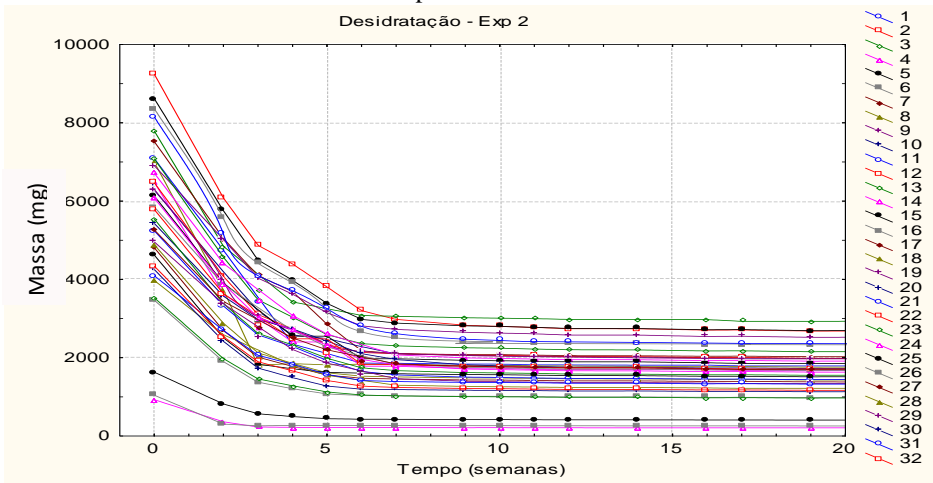


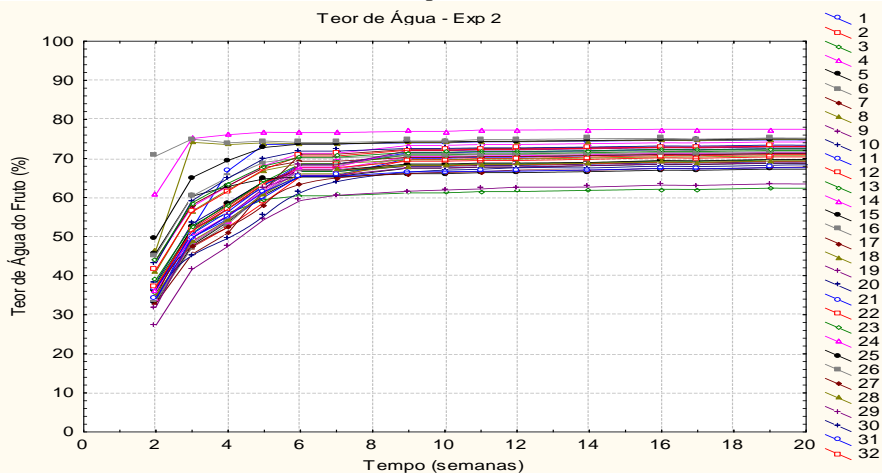
Tabela 11. Teor de água perdida pelos frutos de *P. tenuifila* no decorrer de 20 semanas de armazenamento ao ar livre, a 25°C e UR de 70%.

Teor de Água (%) ^z	Tempo de armazenamento (semanas)											
	2	3	4	5	6	7	9	10	12	16	19	27
Média	39,3	54	59	64,5	68	69	69,9	70	70,5	70,8	71	70,9
DP	8,2	8,1	6,9	5,3	3,8	3,5	3,4	3,3	3,2	3,2	3,1	3,2

^zMédia e desvio padrão dos 32 frutos.

Os gráficos que mostram padrões de variação da perda de água pelos frutos, em porcentagem, em função do tempo de armazenamento estão representados na Figura 19. A maioria dos frutos apresentou o mesmo padrão de perda de água, mais intensa, nas primeiras seis semanas de armazenamento, estabilizando-se a partir da sexta semana, ao redor de 70%, resultados também semelhantes aos obtidos no experimento 1.

Figura 19. Efeito do tempo de desidratação ao ar livre, a 25°C sobre o teor de água (%) perdida pelos frutos (32 frutos) de *P. tenuifila* analisados individualmente durante o decorrer do período de armazenamento.



O teor de água das sementes foi calculado, neste experimento 2, aos 7 meses e 12 meses de armazenamento dos frutos. Os teores de água das sementes dos frutos frescos, no tempo zero, no início do experimento e após 7 e 12 meses de armazenamento dos frutos ao ar livre a 25°C são mostrados na Tabela 12. O teor de água das sementes removidas dos frutos frescos, recém coletados, no início do experimento, foi de 11,44% e diminuiu significativamente após os respectivos períodos de armazenamento, para valores que variaram entre 9,42 e 9,58%, e que não diferiram estatisticamente entre si. Portanto, não houve diferença entre o teor de umidade das sementes de frutos armazenados por 7 meses e por 10 meses, permanecendo constante, e os teores de água dos mesmos foram muito semelhantes aos das sementes de frutos que ficaram armazenados por 10 meses, no experimento 1.

As porcentagens de germinação máximas das sementes de frutos armazenados por 8; 9,5; 12 e 13,5 meses ao ar livre, a 25°C, aos 65 dias do início do experimento são mostradas na Tabela 13. A porcentagem de germinação das sementes dos frutos que ficaram armazenados por 8 meses, 70%, não diferiu significativamente dos armazenamentos por 12 e 13,5 meses, 84,9% e 85,3% respectivamente. Contudo, esses valores diferiram do tratamento de 9,5 meses de armazenamento, que apresentaram 100% de germinação, valor muito diferente e superior ao

apresentado pelas sementes de frutos com 10 meses de armazenamento do experimento 1 (27,14%).

Tabela 12. Efeito do armazenamento dos frutos de *Passiflora tenuifila* ao ar livre a 25°C sobre o teor de água das sementes.

Tempo de armazenamento (meses)	Teor de Água (%) ^z
0	11,4 ± 1,7 b
7	9,6 ± 0,5 a
12	9,4 ± 1,0 a

^zMédia ± desvio padrão do teor de água das sementes de 4 repetições de 15 sementes cada, por tratamento. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Um segundo experimento de germinação foi realizado com sementes de frutos armazenados por 9,5 meses. Foram realizadas 4 repetições com 24 sementes cada e a máxima porcentagem de germinação observada foi de 77,49±11, valor ainda considerável para esse tempo longo de armazenamento, quando se compara com o valor do controle do experimento 1, no início do experimento, sem armazenamento de 80,61%, o que comprova a manutenção da viabilidade.

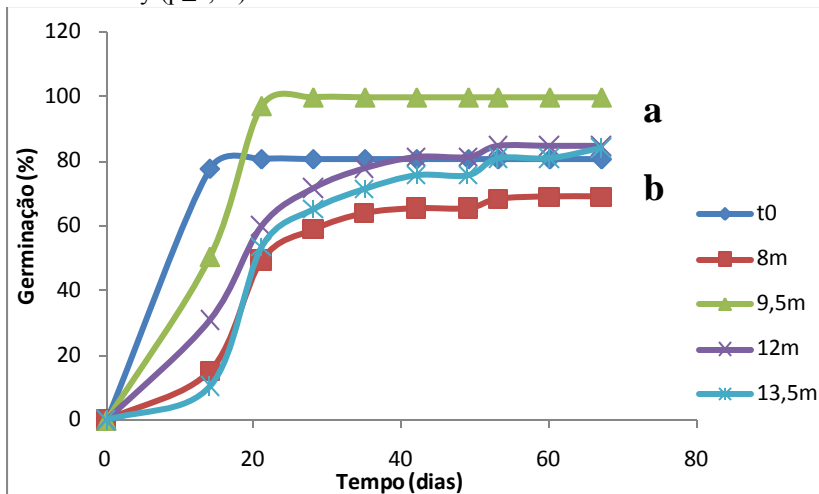
Os padrões de variação das curvas de germinação das sementes, em função do tempo de avaliação dos tratamentos de armazenamento por 0, 8 meses, 9,5 meses, 12 meses e 13,5 meses de frutos ao ar livre, a 25°C são mostrados na Figura 20.

Tabela 13. Efeito do armazenamento dos frutos de *Passiflora tenuifila* ao ar livre a 25°C sobre a germinação (%). Dados aos 65 dias do início do experimento.

Tempo armazenamento (meses)	Germinação (%)
8	70,0 ± 11,5 a
9,5	100 b
12	84,9 ± 7,2 a
13,5	85,3 ± 6,9 a

^zMédia ± desvio padrão das porcentagens de germinação. Valores são médias de 5-6 repetições com 19-27 sementes cada, dependendo do tratamento. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Figura 20. Germinação em função do tempo de sementes de frutos de *P. tenuifila* não armazenados (tempo zero no início do experimento, t0) ou submetidos por 8 meses (8m), 9,5 meses (9,5m), 12 meses (12m) e 13,5 meses (13,5m) de armazenamento ao ar livre, a 25°C. Os valores são médias de 3-5 repetições com 17-27 sementes cada, dependendo do tratamento. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Os resultados indicam que os padrões das curvas de germinação das sementes de frutos com 0 e 9,5 meses de armazenamento foram semelhantes, sendo que as porcentagens máximas de germinação foram alcançadas antes dos 20 dias do início do experimento. Nos demais tratamentos, os padrões das curvas de germinação diferiram dos tratamentos anteriores, com a estabilização da germinação ocorrendo após 20 dias do início do experimento, o que sugere a diminuição da velocidade de germinação das sementes. Mas é importante notar que mesmo com a possível redução das velocidades de germinação, as porcentagens máximas alcançadas ainda foram altas, maiores que 80% nos tratamentos com 12 e 13,5 meses de armazenamento ao ar livre, a 25°C.

Para confirmar a viabilidade das sementes, após longos períodos de armazenamento dos frutos ao ar livre, a 25°C, outros experimentos foram realizados após 9 meses e 12 meses de armazenamento e os resultados são apresentados na Tabela 14, junto com os resultados apresentados acima, de 10 meses, 12 meses e 13,5 meses, para mostrar a variação entre os resultados obtidos nos diferentes experimentos. Esses

resultados foram comparados com o controle, em que as sementes foram removidas de frutos frescos e colocadas imediatamente para germinar.

Tabela 14. Efeito do armazenamento dos frutos de *Passiflora tenuifila* ao ar livre a 25°C sobre a germinação (%). Dados aos 65 dias do início do experimento.

Tempo de armazenamento (meses)	Germinação (%)
0	80,6 ± 2,8 b
9	52,4 ± 29,0 a
10	38,6 ± 9,6 a
12	40,0 ± 13,0 a
12	69,0 ± 17,3 ab
12	84,9 ± 7,2 b
13,5	85,3 ± 6,9 b

^aMédia ± desvio padrão das porcentagens de germinação. Valores são médias de 5 - 6 repetições de 14 - 22 sementes, dependendo do tratamento. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em 3 dos 4 experimentos de armazenamento dos frutos por 12 a 13,5 meses a viabilidade manteve-se no mínimo em 69%, chegando a atingir ao redor de 85% em dois dos experimentos. Apenas em um dos experimentos foi de 40%. Esses dados confirmam a manutenção da alta viabilidade das sementes nesses períodos de armazenamento. Nos 3 experimentos realizados com períodos entre 9 e 10 meses de armazenamento, a viabilidade manteve-se entre 39 e 52%, e apenas em um experimento, com 9,5 meses de armazenamento, chegou a 100%.

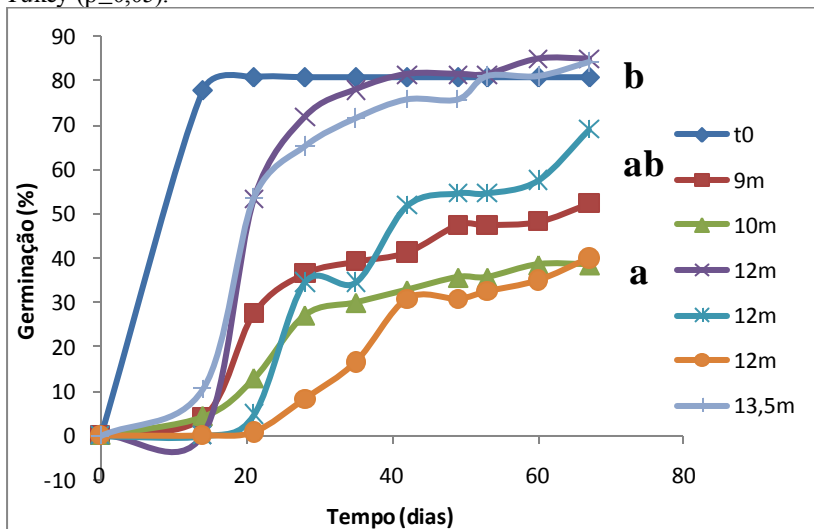
Esses resultados sugerem que é possível manter a alta viabilidade das sementes através de períodos de até 13,5 meses de armazenamento ao ar livre, a 25°C.

As curvas de germinação das sementes, em função do tempo de avaliação dos tratamentos de armazenamento por 0, 9 meses, 10 meses, 12 meses e 13,5 meses de frutos ao ar livre, a 25°C estão representadas na Figura 21.

Os resultados indicam que o padrão da curva de germinação das sementes de frutos frescos, que não foram armazenados, diferiu dos padrões das curvas de germinação dos demais tratamentos, pois as porcentagens máximas de germinação foram alcançadas antes dos 20 dias do início do experimento, enquanto nos demais tratamentos a germinação estabilizou-se ao redor de ou após 40 dias, confirmando os

resultados dos experimentos anteriores e sugerindo uma diminuição na velocidade de germinação das sementes dos frutos armazenados por longos períodos. E, apesar disso, apenas em dois dos experimentos, de 12 meses e 13,5 meses, as porcentagens máximas de germinação ainda foram semelhantes ao controle, realizado com as sementes não armazenadas, removidas dos frutos frescos e colocadas para germinar imediatamente.

Figura 21. Germinação em função do tempo de sementes de frutos de *P. tenuifolia* não armazenados (tempo zero no início do experimento, t0) ou submetidos por 9 meses (9m), 10 meses (10m), 12 meses (12m) e 13,5 meses (13,5m) de armazenamento ao ar livre, a 25°C. Os valores são médias de 5 - 6 repetições de 14 - 22 sementes, dependendo do tratamento. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Os resultados desses experimentos indicam que, no armazenamento ao ar livre, a 25°C dos frutos de *P. tenuifolia*, de 9 experimentos realizados, por períodos de 7-13,5 meses de armazenamento, períodos longos, as porcentagens de germinação variaram entre 70% e 100% e apenas em 3 experimentos as taxas de germinação variaram entre 27,14% e 52,3%.

4.1.4. Efeito da criopreservação na germinação de sementes de *P. tenuifila*

Nesse experimento as sementes foram removidas de frutos secos armazenados por 16 meses em caixa de papelão a 25°C. As sementes foram retiradas dos frutos, tiveram o arilo removido, foram imersas em nitrogênio líquido por 1 hora, colocadas para embeber por 5 dias em solução de 2,5% de GA e em seguida colocadas para germinar em solo, em condições controladas a 25°C. O controle foi realizado com sementes não expostas ao nitrogênio líquido, mas embebidas, por 5 dias, em solução de 2,5% de GA.

Não foi possível determinar o teor de água das sementes de frutos armazenados por 16 meses em temperatura ambiente. Mas, os teores de água das sementes armazenadas nas mesmas condições, por 12 meses são apresentados na Tabela 15 e observa-se que o teor de água era de 9,21%, o que indica que esse deve ter sido um valor aproximado de teor de água das sementes que ficaram armazenadas por 16 meses, utilizadas no experimento de criopreservação.

Tabela 15. Teor de água de sementes de *Passiflora tenuifila* removidas dos frutos maduros após 12 meses de armazenamento ao ar livre em temperatura ambiente.

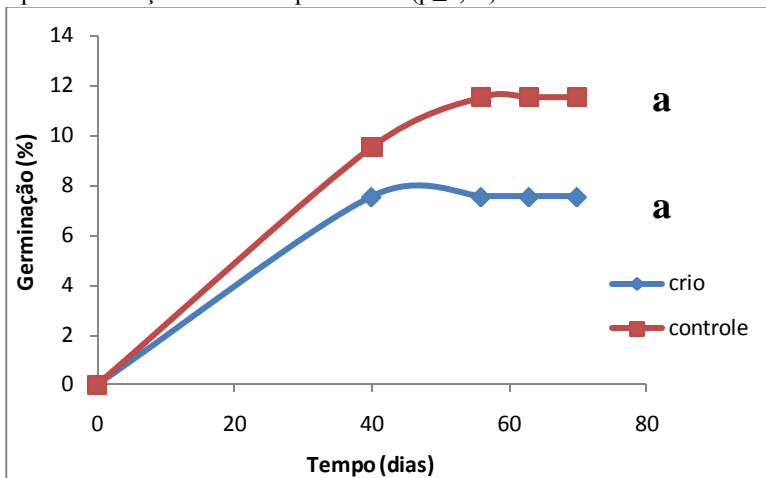
Repetições	Teor de água (%MF)
1	10,5
2	9,8
3	9,2
4	8,0
5	8,6
Média±DP	9,2 ± 0,9

Valores são médias de 5 repetições de 15 sementes cada.

Na Figura 22 estão expressos os resultados das porcentagens de germinação em função do tempo de ambos os tratamentos, que mostram que, com 40 dias do início do experimento, a máxima taxa de germinação alcançada no tratamento de criopreservação foi de 7,6% e no controle foi de 10,6%, valores que não diferiram significativamente entre si, indicando não haver diferença entre os tratamentos.

As análises dos resultados obtidos para as 5 repetições do tratamento em que as sementes foram criopreservadas e das 5 repetições do controle indicaram que, no caso das sementes criopreservadas, as taxas de germinação variaram entre 4,54% e 14,28%, valores muito próximos aos observados no controle, que variaram entre 5% e 23,8%.

Figura 22. Germinação de sementes de *Passiflora tenuiflora* submetidas ou não à criopreservação por 1 hora em nitrogênio líquido. Valores são médias de 5 repetições com 20-21 sementes cada. As letras compararam os tratamentos no tempo de avaliação de 70 dias pelo teste t ($p \leq 0,05$).



Esses resultados indicam que as sementes sobreviveram à exposição ao nitrogênio líquido e o potencial de aplicação de técnicas criogênicas para a conservação de sementes de *P. tenuiflora*, mas o experimento necessita ser repetido, pois a taxa de germinação do controle também foi muito reduzida.

4.2. GERMINAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *P. TENUIFILA*

Os experimentos descritos a seguir foram realizados com o objetivo de verificar se as sementes germinariam *in vitro*, para possibilitar o estabelecimento de sistemas de cultura *in vitro*, micropropagação e cultura de calos, a partir de plântulas axênicas de *P. tenuiflora* e também testar o método de conservação de sementes, através da conservação *in vitro* dos endocarpos.

4.2.1. Germinação *in vitro* de sementes

No experimento descrito a seguir, as sementes foram removidas dos frutos frescos, tiveram os arilos removidos e foram embebidas em solução 2,5% de GA por 5 dias, submetidas a vários tempos de desinfecção em água sanitária comercial e inoculadas em meio de cultura MS.

Os resultados expressos na Tabela 16 indicam que ao redor dos 43 dias do início do experimento as porcentagens de germinação das sementes desinfetadas por 10 e 20 minutos com água sanitária comercial foram maiores (entre 90,6 e 91,1%) do que a observada para o tempo de desinfecção de 30 minutos (20,6%).

Tabela 16. Efeito do tempo de desinfecção em água sanitária comercial (2,5% de cloro ativo) sobre a germinação *in vitro* de sementes de *Passiflora tenuifila*. Dados aos 43 dias do início do experimento.

Tempo de imersão (min)	Germinação (%)	Contaminação (%)
10	91,1 ± 14,4 b	33,33
20	90,6 ± 16,4 b	0,0
30	20,6 ± 20,6 a	0,0

^zMédia ± desvio padrão das porcentagens de germinação. Valores são médias de 6 repetições de 6 sementes cada. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Na Figura 23 são mostradas as curvas de germinação das sementes, em função do tempo de cultivo dos diferentes tratamentos. Verifica-se que, com 20 dias do início do experimento, as taxas de germinação alcançadas nos tratamentos de desinfecção com 10 e 20 minutos de hipoclorito, respectivamente de 91,1% e 73,9% não diferiram significativamente entre si, mas foram muito superiores à taxa observada na desinfecção por 30 minutos em hipoclorito, de 7,5%.

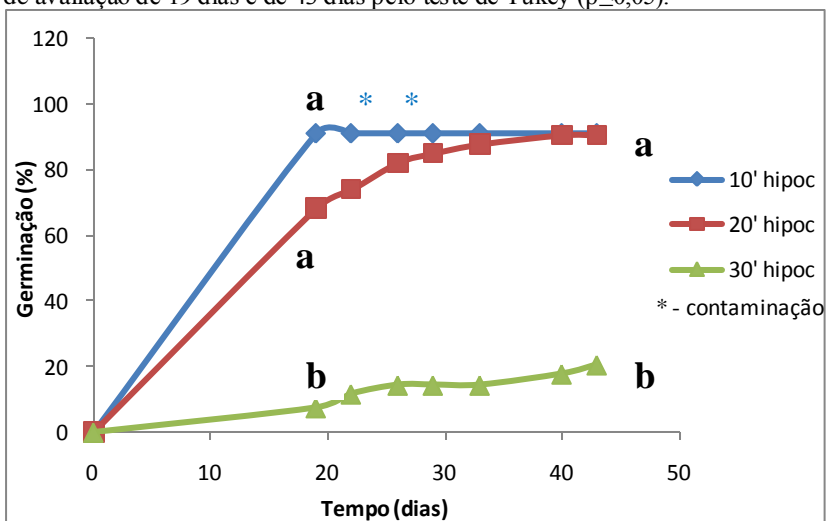
Essa diferença permaneceu durante o decorrer de todo o experimento, sendo que ao final dos 43 dias de avaliação as taxas de germinação dos tratamentos com 10 e 20 minutos de desinfecção foram estatisticamente semelhantes, de 91,1% e 90,6%, respectivamente, enquanto que no tratamento com 30 minutos em hipoclorito a máxima taxa observada foi de 20,6% de germinação.

Verifica-se também que, no tratamento com 10 minutos de desinfecção a germinação estabilizou já a partir dos 20 dias do início do experimento, enquanto que no tratamento com 20 minutos de desinfecção a germinação estabilizou ao redor dos 40 dias, a partir do início do experimento, sugerindo que o tempo de exposição maior ao hipoclorito de sódio inibiu e retardou o processo de germinação das sementes.

Apesar de no tratamento de desinfecção por 10 minutos ter havido rápida germinação, um terço das repetições (2 das 6) contaminou, mas a contaminação não foi suficiente para impedir a germinação e o crescimento das plântulas. Os outros tratamentos não

contaminaram até o final do experimento. Portanto, deve-se repetir este experimento, com tempos intermediários, entre 10 e 20 minutos de desinfecção em hipoclorito de sódio, para otimizar o tempo de desinfecção, para manter a alta e rápida germinação além da total desinfecção das sementes.

Figura 23. Germinação *in vitro* de sementes de *Passiflora tenuifila* submetidas à desinfecção por 10, 20 e 30 minutos em solução comercial de hipoclorito de sódio, com 2,5% de cloro ativo e posterior inoculação em meio de cultura MS suplementado com 2% de sacarose e 0,2% de Phytigel. Valores são médias de 6 repetições de 6 sementes cada. As letras comparam os tratamentos nos tempos de avaliação de 19 dias e de 43 dias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Esses resultados indicam que o tempo ótimo de exposição das sementes de *P. tenuifila* ao hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo é próximo de 20 minutos, pois garantiu alta germinação e máxima taxa de desinfecção das sementes. A germinação das sementes *in vitro* foi tão eficiente como a germinação em solo, seguindo o mesmo padrão de germinação de experimentos anteriores, por exemplo, das sementes removidas dos frutos frescos e colocadas para germinar em solo, após a embebição por 5 dias em 2,5% de GA, mostrado no experimento com GA, na Figura 12 e do tratamento de germinação realizado, sob as mesmas condições, no tempo zero, na Figura 17.

4.2.2. Efeito do armazenamento das sementes de *P. tenuifila*, envolvidas pelo endocarpo e mantidas *in vitro* a 5°C e 25°C, na germinação

Nesses experimentos as sementes envolvidas pelo endocarpo ficaram armazenadas *in vitro*, em meio de cultura MS semi-sólido sem sacarose. Após 4, 8, 17 e 18 meses de armazenamento em câmara de crescimento a (25°C) ou em geladeira (5°C). Os endocarpos foram removidos, abertos e as sementes removidas e submetidas ao teste de determinação do teor de água ou embebidas por 5 dias em solução de 2,5% de ácido giberélico, antes de serem colocadas para germinar.

Na Tabela 17 estão os valores de teor de água das sementes durante, alguns, dos diferentes períodos de armazenamento. No início do experimento, o teor de água das sementes foi de 11,44% e não diferiu estatisticamente dos teores de água observados em todos os períodos e temperaturas de armazenamento nos endocarpos. No tratamento de armazenamento a 25°C por 4 meses, o teor de umidade das sementes foi menor do que nos tratamentos de 8 meses de armazenamento, tanto a 5°C como a 25°C.

Tabela 17. Efeito da temperatura e do período de armazenamento *in vitro* de sementes de *Passiflora tenuifila* envolvidas pelo endocarpo obre o teor de água das sementes.

Tipo de armazenamento	Tempo de armazenamento (meses)	Teor de água (%) ^z
5°C	0	11,4 ± 1,67 ab
	4	11,8 ± 0,90 ab
	8	14,0 ± 1,25 b
	17	11,9 ± 0,93 ab
25°C	4	10,1 ± 0,53 a
	8	13,2 ± 0,25 b
	17	11,5 ± 2,12 ab

^zMédia ± desvio padrão do teor de água de 4 repetições de 25 sementes cada por tratamento. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p≤0,05).

O gráfico da Figura 24 ilustra os padrões de variação no teor de água das sementes mantidas nos endocarpos, conservados *in vitro*, por 0, 4, 8 e 17 semanas, a 5°C e 25°C.

Figura 24. Variação do teor de água de sementes de *Passiflora tenuiflora* com o decorrer do período de armazenamento *in vitro* dos endocarpos a 5°C e 25°C, por 0, 4, 8 e 17 semanas. Valores são médias de 4 repetições de 25 sementes por tratamento. As letras comparam os tratamentos em cada período de armazenamento pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

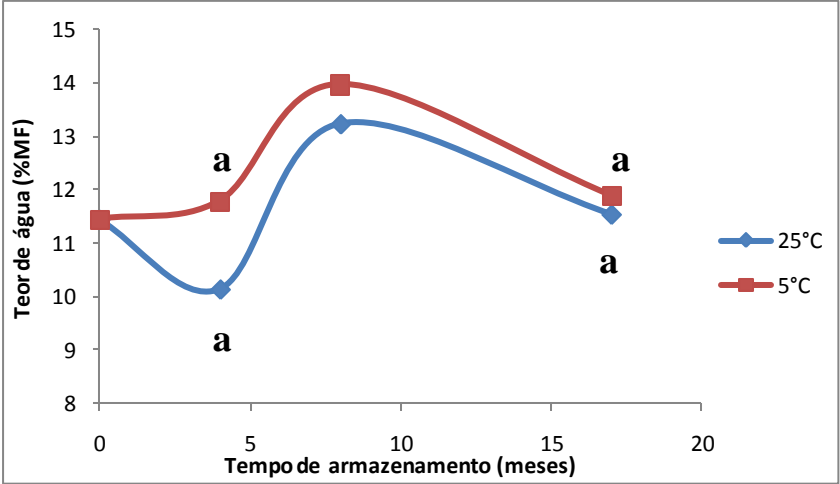


Tabela 18. Efeito da temperatura e do período de armazenamento *in vitro* das sementes de *Passiflora tenuiflora*, envolvidas pelo endocarpo, na germinação aos 35 dias do início do experimento.

Tipo de armazenamento	Tempo de armazenamento (meses)	Germinação (%) ^z
5°C	0	80,6 ± 2,8 b
	4	80,8 ± 11,3 b
	8	50,0 ± 9,5 a
	17	55,0 ± 7,1 a
	18	97,8 ± 3,8 c
25°C	4	69,2 ± 9,3 b
	8	0,0
	17	0,0
	18	0,0

^zMédia ± desvio padrão de 4-5 repetições de 25-30 sementes cada por tratamento. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste t ($p \leq 0,05$).

As porcentagens máximas de germinação das sementes do tratamento controle (germinação das sementes removidas de frutos

frescos no tempo zero, realizado no início do experimento de armazenamento) e dos tratamentos de armazenamento *in vitro* dos endocarpos por 4, 8, 17 e 18 meses a 25°C e 5°C são mostradas na Tabela 18. Em todos os casos as sementes foram embebidas em solução aquosa de 2,5% de GA antes de serem colocadas para germinar.

Verifica-se que não houve diferença significativa entre a porcentagem de germinação do controle, no início do experimento e as porcentagens de germinação nos tratamentos de armazenamentos dos endocarpos a 5°C e 25°C, por 4 meses. Porém, após 8 e 17 meses de armazenamento a 5°C, a germinação diminuiu significativamente para 50% e 55%, respectivamente. Aos 18 meses de armazenamento a 5°C, a porcentagem de germinação das sementes foi superior à observada no controle, no início do experimento (97,77%). Nos tratamentos de armazenamento dos endocarpos a 25°C por 8, 17 e 18 meses, as sementes não germinaram.

Para verificar se a embebição das sementes em GA ainda teria efeito sobre a germinação das sementes armazenadas nos endocarpos *in vitro*, por 4 meses a 5°C e 25°C, foi realizado, para esse período de armazenamento, um experimento para comparar as curvas de germinação das sementes embebidas em GA ou água com a curva de germinação do controle, realizada no início do experimento, com sementes também embebidas em GA. As curvas de germinação estão representadas na Figura 25.

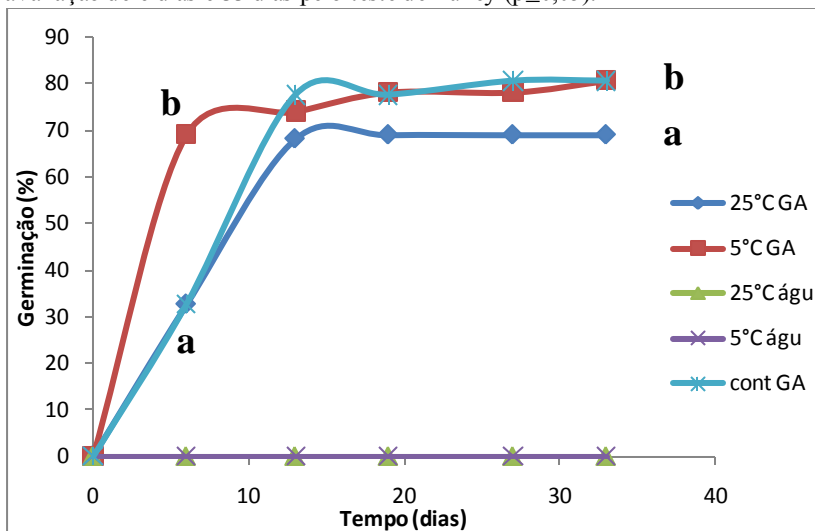
Verifica-se que, nos tratamentos em que as sementes foram embebidas em água não ocorreu germinação, enquanto que nos tratamentos em que as sementes foram embebidas em GA ocorreu a germinação.

Observa-se que, ao redor do sexto dia do início do experimento, a taxa de germinação das sementes nos endocarpos armazenados a 5°C (69,2%) foi significativamente superior em relação às taxas de germinação das sementes no armazenamento a 25°C e no controle realizado no início do experimento (ao redor de 32%).

Os padrões das curvas de germinação do controle e de 4 meses de armazenamento a 25°C e 5°C são muito parecidos com a germinação, estabilizando entre 10 e 20 dias do início do experimento.

O armazenamento a 5°C por 4 meses promoveu a velocidade de germinação em relação ao armazenamento a 25°C e ao controle realizado no início do experimento.

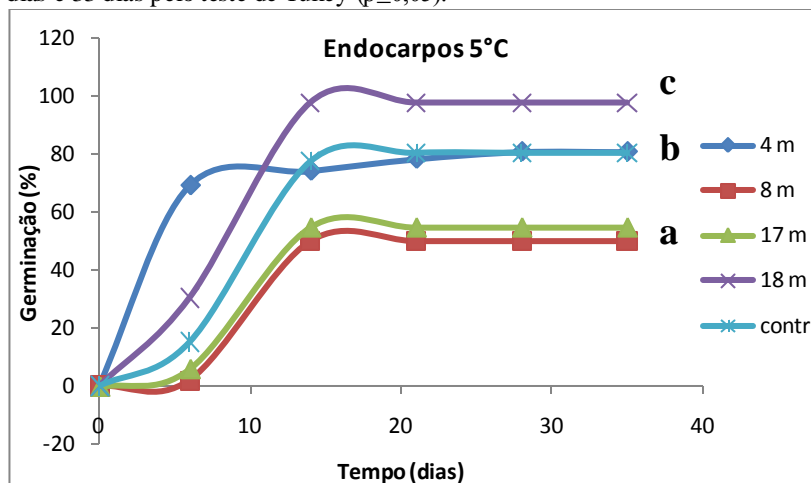
Figura 25. Germinação de sementes de *Passiflora tenuifila* envolvidas pelo endocarpo e armazenadas *in vitro* em temperaturas de 25°C e de 5°C, por 4 meses, e embebidas, por 5 dias em solução aquosa de 2,5% de GA ou água, antes de serem colocadas para germinar. Valores são médias de 5 repetições com 17-30 sementes cada. As letras comparam os tratamentos no tempo de avaliação de 6 dias e 33 dias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



As curvas de germinação em função do tempo das sementes nos endocarpos armazenados *in vitro* a 5°C, por 4, 8, 17 e 18 meses e a 25°C, por 4 meses estão representadas na Figura 26. Observa-se que o padrão da curva de germinação do tratamento de armazenamento, por 4 meses a 5°C, diferiu em relação aos padrões das curvas dos demais tratamentos, incluindo o controle, pois nesse tratamento a germinação ao sexto dia do início do experimento foi superior (64,4%) em relação aos demais tratamentos, além de que nesse tratamento a germinação pareceu estabilizar-se já ao redor do décimo dia, a partir do início do experimento, enquanto que nos demais tratamentos isso ocorreu entre 10 e 20 dias, mesmo após 18 meses de armazenamento dos endocarpos *in vitro*, indicando uma diminuição nas velocidades de germinação.

Esses resultados indicam a eficiência da temperatura de 5°C em manter a viabilidade das sementes armazenadas nos endocarpos *in vitro*, por longos períodos, entre 50% e 97,7%, para períodos de 8 a 18 meses de armazenamento.

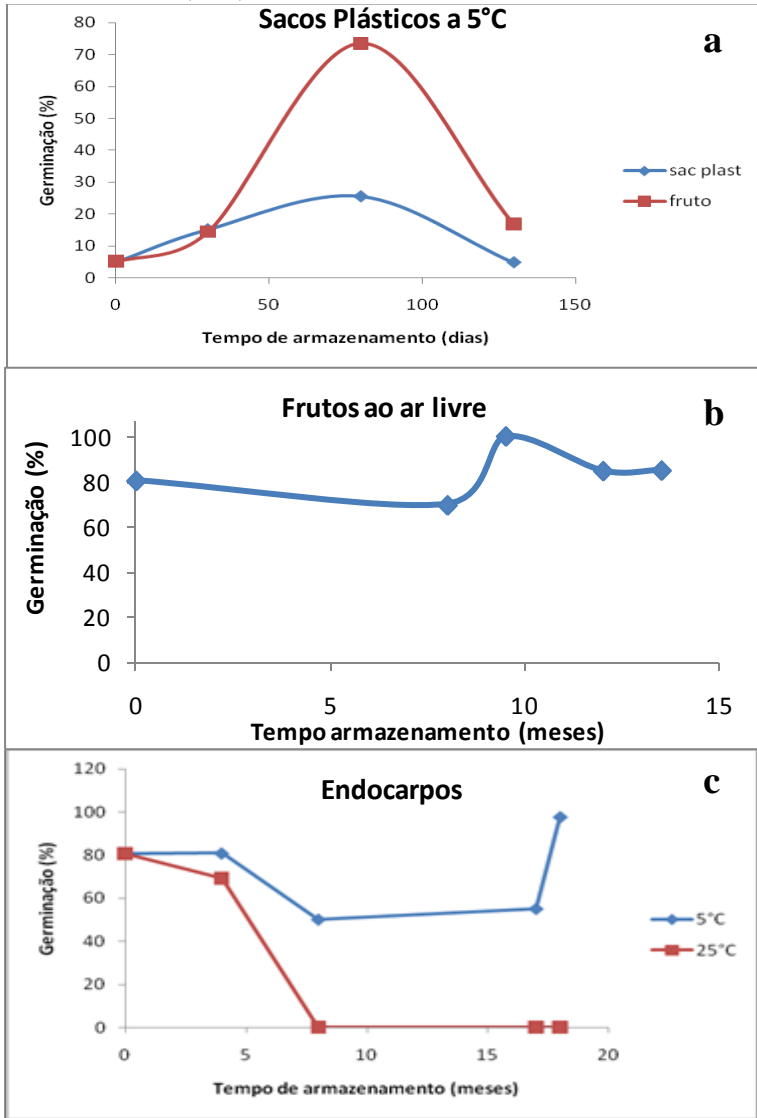
Figura 26. Germinação de sementes de *Passiflora tenuiflora* armazenadas nos endocarpos mantidos *in vitro* em temperatura de 5°C, por 4, 8, 17 e 18 meses, e embebidas, por 5 dias em solução aquosa de 2,5% de GA, antes de serem colocadas para germinar. Valores são médias de 5 repetições com 17-30 sementes cada. As letras compararam os tratamentos no tempo de avaliação de 6 dias e 33 dias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Na Figura 27 estão os gráficos comparando a germinação das sementes de *P. tenuiflora*, em função do tempo de armazenamento, nas diferentes condições estudadas. Observa-se que, entre todos os métodos de armazenamento, a manutenção das sementes dentro dos frutos foi superior e mais, a manutenção das sementes no interior dos frutos dessecados ao ar livre, a 25°C ou envolvidas pelo endocarpo e mantidas *in vitro* a 5°C foram mais eficientes, a longo prazo, do que o armazenamento das sementes nos frutos, em sacos plásticos a 5°C.

Não há na literatura sobre germinação e armazenamento de sementes de *Passiflora* spp. referências sobre a realização de experimentos de conservação *in vitro* de sementes envolvidas pelo endocarpo, como os relatados nesse trabalho. O fato é que este método de conservação foi muito eficiente, pois aos 12 dias de avaliação as porcentagens de germinação das sementes armazenadas por 8 meses a 5°C foi de 40,8% (dado não apresentado no gráfico), valor semelhante (46,5%) ao obtido, no mesmo período de avaliação, para as sementes em frutos armazenados a 25°C ao ar livre, por 7 meses.

Figura 27. Germinação de sementes de *Passiflora tenuiflora* armazenadas (a) a 5°C, em frutos em sacos plásticos e em sacos plásticos (4.1.1); (b) a 25°C, em frutos, ao ar livre (4.1.3), e; (c) a 5°C e 25°C envolvidas pelo endocarpo e mantidas *in vitro* (4.2.2).



4.3. CULTURA *IN VITRO* DE *P. TENUIFILA*

Este experimento teve como objetivo verificar o efeito de fontes de carbono sobre o crescimento *in vitro* de microplantas de *P. tenuifila*. Os segmentos caulinares foram removidos das plantas, desinfectados e inoculados em meio de cultura MS, suplementado com 88,5 mM de sacarose ou glicose. Após 3 meses de cultivo as culturas foram avaliadas quanto ao crescimento e os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 19 e 20.

Na Tabela 19 estão os resultados da morfogênese apresentada pelas microplantas das 3 repetições realizadas para cada tratamento. Verifica-se que a formação de ramos ocorreu em 100% das culturas, tanto em sacarose como em glicose. Porém, o número de ramos com raízes foi muito baixo (ao redor de 5% das culturas em sacarose) e entre 5-14% das culturas, com glicose. As porcentagens de indução de calos na base dos explantes ocorreu em 100% das microplantas em glicose, enquanto que em sacarose as porcentagens de indução de calos variaram entre 76 e 100%.

Tabela 19 – Efeito de sacarose e glicose na morfogênese *in vitro* de microplantas de *Passiflora tenuifila* cultivadas por 3 meses em meio de cultura MS, suplementado com 88,5 mM de sacarose ou glicose e 0,2% de Phytigel™.

Fonte de Carbono	Repetição	No. de explantes inoculados	Ramos (%)	Ramos /microplanta	Ramo + Raiz (%)	Calos (%)
Sacarose	1	20	100	1	5	90
	2	21	100	1,095	4,762	76,2
	3	29	100	1	0	100
Glicose	1	21	100	1,238	0	100
	2	21	100	1,095	14,286	100
	3	20	100	1,2	5	100

Na Tabela 20 são apresentados os resultados do crescimento em altura e número de folhas apresentados pelas microplantas. A análise estatística dos resultados indicou que, em glicose, a altura das microplantas atingiu valores médios significativamente maiores (entre 7,9 e 9,9 cm), até cinco vezes maiores do que as alturas das microplantas cultivadas em sacarose (entre 1,8 e 3,1 cm). O número de folhas produzidas por microplanta foi praticamente o dobro (entre 16,2 e 19,3 folhas/microplanta) em glicose, mostrando que essa fonte de carbono estimulou significativamente o crescimento das microplantas em relação à sacarose, parecendo ser melhor metabolizada do que a sacarose.

Tabela 20 – Efeito de sacarose e glicose no crescimento *in vitro* de microplantas de *Passiflora tenuifolia* cultivadas por 3 meses em meio de cultura MS suplementado com 88,5 mM de sacarose ou glicose e 0,2% de Phytigel™.

Fonte de Carbono	Repetição	Parâmetros ^z	
		Altura (cm)	Nº de Folhas
Sacarose	1	2,175 ±1,86 a	10,95 ±4,12 ab
	2	3,133 ±1,81 a	9,571 ±6,83 a
	3	1,835 ±0,76 a	9,235 ±4,47 a
Glicose	1	9,900 ±4,35 b	19,00 ±7,64 c
	2	7,976 ±5,75 b	16,29 ±8,81 bc
	3	9,530 ±5,45 b	19,25 ±9,57 c

^zMédia ± desvio padrão de no mínimo 20 repetições seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Pode-se inferir, por esses resultados, que a glicose foi a melhor fonte de carbono para viabilizar o crescimento e a multiplicação das microplantas, pois, tomando-se por base que na axila de cada folha há uma gema axilar, o aumento do número de folhas por microplanta e da altura sugere um número maior de nós foliares que podem ser utilizados no processo de multiplicação em larga escala.

5. DISCUSSÃO

5.1. EFEITO DO ARMAZENAMENTO EM GELADEIRA (5°C) DE FRUTOS E SEMENTES EM SACOS PLÁSTICOS NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *P. tenuifila* E *P. SETACEA*

O aumento no nível de água das sementes de *P. tenuifila*, quando armazenadas a 5°C nos frutos em sacos plásticos por 80 e 130 dias, em relação ao período de 30 dias, pode ter sido devido ao fato de que nesses períodos de armazenamento as polpas dos frutos, de ambas as espécies, entraram em decomposição, ficando liquefeitas, o que talvez tenha promovido a embebição das sementes, durante o período em que permaneceram imersas na polpa liquefeita, a partir de 60 dias de armazenamento.

Os valores de pH da polpa liquefeita foram de 7,5, para 5 meses de armazenamento, e de 7,91, para frutos armazenados por 6 meses. A análise bioquímica mais detalhada do líquido produzido a partir da decomposição das polpas poderá indicar se são produzidos compostos que poderiam estar atuando sobre o tegumento das sementes, amolecendo-o e facilitando a hidratação das mesmas.

A exposição das sementes e frutos a 5°C, por até 130 dias, estimulou a germinação das sementes de ambas as espécies, talvez acionando algum mecanismo de quebra de dormência, mas, o mais intrigante é que não funcionou tão bem para as sementes de *P. tenuifila* armazenadas em sacos plásticos, porém funcionou para as sementes dessa espécie mantidas nos frutos, sugerindo que o efeito promotor da baixa temperatura estaria associado com uma possível necessidade de manutenção das sementes dessa espécie nos frutos, talvez para que a semente complete o seu desenvolvimento ou passe por algum processo de pós-maturação.

O fato das sementes de *P. tenuifila* mantidas nos frutos armazenados em sacos plásticos a 5°C, justamente aos 80 dias apresentarem a máxima germinação entre todos os tratamentos (73,6%), o mesmo ocorrendo com as sementes de *P. setacea* (83,2%), indica que a alteração no estado físico da polpa, devido à possível fermentação, pode ter favorecido a germinação das sementes, seja pela possível produção de compostos que tenham contribuído para amolecer o tegumento e favorecer a entrada da água, ou pela produção de compostos promotores da germinação ou ainda por permitir a possível lixiviação de inibidores de germinação.

A lixiviação de inibidores pode ter ocorrido nesses casos, pois, de acordo com Ellis, Hong e Roberts (1985), as espécies de *Passiflora*

apresentam dormência exógena, que é uma combinação de dormência mecânica (tegumento que restringe o crescimento da radícula) e química (presença de inibidores no tegumento). As sementes apresentam apenas um endosperma residual e o embrião maduro. Apresentam um tegumento lenhoso que contém uma camada interna semi-permeável, que permite a embebição, mas contém inibidores fortes, que não são lixiviados facilmente. Alguns inibidores estão localizados no endosperma residual que envolve o embrião ou dentro dos cotilédones e são impedidos de lixiviar pela testa membranosa semi-permeável que compõe o tegumento. Assim, é possível sugerir que as sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea* tenham dormência exógena química, devido à presença de inibidores nos tecidos de revestimento das sementes.

Mas, em ambas as espécies, a baixa germinação (*P. tenuifila*) ou ausência de germinação (*P. setacea*) das sementes, aos 130 dias de armazenamento dos frutos em sacos plásticos, sugere que a exposição prolongada ao ambiente fisiológico interno do fruto em fermentação pode ter contribuído para tornar as sementes inviáveis, talvez pela possível degradação das reservas ocasionada pelos microrganismos, uma vez que a temperatura de armazenamento de 5°C minimizou, mas não impediu o metabolismo da respiração, o que pode ser comprovado pela incidência de microrganismos e fermentação dos frutos. Estudos mais aprofundados sobre o mecanismo e os produtos gerados pela fermentação das polpas ou pelos próprios microrganismos e o papel dos mesmos sobre o tegumento das sementes e seu metabolismo devem ser conduzidos para elucidar essa questão.

A alta correlação linear negativa entre teor de água e porcentagem de germinação das sementes de *P. setacea* armazenadas em sacos plásticos sugere a necessidade de um mecanismo de desidratação das sementes para promover a germinação. Muitas sementes de outras espécies perdem a dormência quando os seus teores de água são reduzidos a certo nível, o que é conhecido como o processo de pós-maturação (TAIZ; ZEIGER, 2009). É possível que o embrião dessas sementes estivesse fisiologicamente imaturo (dormência morfológica), sendo necessário dar as condições favoráveis para o seu desenvolvimento, condições essas que parece terem ocorrido durante os 130 dias de armazenamento a 5°C. Ou ainda, que o próprio embrião estivesse completamente desenvolvido, mas em dormência fisiológica (devido a fatores internos do embrião, que podem inibir a germinação), sendo que a baixa temperatura pode ter auxiliado, também, facilitando as trocas gasosas e a embebição, talvez através da indução de alterações no tegumento das sementes. Nesse caso talvez os efeitos da desidratação

e da baixa temperatura, que ocorreram simultaneamente podem ter contribuído para atuar conjuntamente na quebra da dormência.

Um exemplo de como a baixa temperatura poderia atuar na quebra da dormência morfológica ou fisiológica seria semelhante ao que acontece quando a baixa temperatura atua na vernalização das plantas, em que o gene que atua como repressor da floração é desligado, pela exposição ao frio, pelo resto da vida da planta, permitindo que ocorra a floração. Segundo Taiz e Zeiger (2009), isso pode acontecer pois a baixa temperatura pode silenciar o gene repressor, através da indução de alteração na estrutura da cromatina (remodelação da cromatina), fazendo com que a cromatina do gene repressor perca as modificações da histona, própria da eucromatina, e adquira modificações como a metilação de resíduos específicos de lisina, características da heterocromatina e causando o silenciamento desse gene.

Esse mecanismo poderia atuar nas sementes de ambas as espécies, tanto nas mantidas nos frutos armazenados em sacos plásticos como naquelas armazenadas em sacos plásticos (de forma muito intensa nas sementes de *P. setacea*), com o frio silenciando os genes repressores da germinação e/ou ativando a expressão dos genes promotores (incluindo a síntese de giberelinas), indicando a presença de dormência endógena morfológica (embrião com desenvolvimento incompleto) e/ou fisiológica (fatores internos do embrião inibidores da germinação).

A necessidade de desidratação das sementes associada à baixa temperatura pareceu estar presente nas sementes de *P. setacea*, mas não de forma tão marcante nas sementes de *P. tenuifila*, apesar do aumento observado na porcentagem de germinação das sementes armazenadas em sacos plásticos, por 80 dias, em que a germinação aumentou em cinco vezes em relação ao controle de sementes não armazenadas. Nesse caso, a germinação pode ter sido estimulada, em *P. tenuifila*, pelo fator baixa temperatura, já que o nível de correlação entre os teores de água e porcentagens de germinação das sementes de *P. tenuifila* foram muito baixos. Talvez, por uma razão na constituição do tegumento, as variações nos teores de água (de 11,05% para 9,71%, após 130 dias de armazenamento) não diferiram significativamente. É possível que, nessa espécie, os tegumentos das sementes podem ser mais impermeáveis e funcionem como uma barreira, impedindo a perda de água do interior da semente. Daí a necessidade de manutenção das sementes nos frutos, a fermentação das polpas, após 80 dias de armazenamento, que, por alguma razão, favoreceu a hidratação das sementes, promovendo a germinação.

Pereira *et al.* (2008), estudando o armazenamento de sementes de *P. cincinnata* por 7, 14, 60 e 90 dias em diferentes condições (sacos de papel em temperatura ambiente e a 10°C, e; em areia úmida a 10°C), não observaram diferença estatística entre os tipos de armazenamento e a porcentagem mais alta obtida, aos 60 dias, foi de 18,5%, valor bem menor do que o obtido no presente trabalho para as sementes armazenadas em sacos plásticos e frutos de *P. setacea*, após 130 e 80 dias de armazenamento, respectivamente e para *P. tenuifila* (sementes armazenadas em frutos por 80 dias). Observaram também que a taxa de germinação reduzia após esse período (90 dias), resultados semelhantes aos aqui mostrados para o período de 130 dias para ambas as espécies.

Em um trabalho posterior, Pereira *et al.* (2011), agora além de *P. cincinnata*, também com *P. alata* e *P. setacea*, estudando o armazenamento por 0, 7, 60 e 120 dias, nas mesmas condições, obtiveram resultados específicos para cada espécie. Para *P. cincinnata* novamente, a germinação com 60 dias de armazenamento mostrou-se a mais eficaz, independente do método. Para *P. setacea*, o armazenamento em geladeira não se mostrou efetivo para os autores (germinação máxima de 7%), resultados muito inferiores aos observados para *P. setacea* no presente trabalho, em que altas porcentagens de germinação foram observadas por até 130 de armazenamento das sementes, tanto em sacos plásticos, como nos frutos. O melhor método relatado pelos autores foi a estratificação em areia úmida a 10°C, com a evolução na taxa de germinação conforme o tempo de armazenamento (1%, 13,5%, 16,5% e 26,5% respectivamente). Apesar dos resultados conflitantes para o armazenamento em geladeira, a baixa temperatura se mostrou benéfica para a germinação de *P. setacea*, em ambos os trabalhos.

Os resultados obtidos por Cardona *et al.* (2005), os quais, estudando métodos de armazenamento de sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa*, mostraram os melhores resultados com as sementes armazenadas em sacos plásticos em geladeira no período de 60 e 90 dias de armazenamento (98% e 91,7%, respectivamente). Aos 120 dias, a germinação declinou, apesar de se manter num valor semelhante ao das sementes recém colhidas (de 73, 5% para 74,5%), fato que não ocorreu para *P. tenuifila*, já que esse método não foi efetivo, com apenas um quarto das sementes germinadas em 80 dias de armazenamento, em sacos plásticos, nem para *P. setacea*, em que, com esse método de armazenamento os valores máximos de germinação foram alcançados com 130 dias.

Assim, é possível sugerir que as sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea* tenham dormência exógena química, devido à presença de

inibidores nos tecidos de revestimento das sementes, que pode ser quebrada pela lixiviação dos inibidores associada à dormência endógena morfológica (devido ao embrião ter desenvolvimento incompleto) e/ou dormência fisiológica (devido a fatores internos do embrião que inibem a germinação) e que pode ser superada pela exposição, por períodos prolongados à baixa temperatura.

5.2. EFEITO DE ÁCIDO GIBERÉLICO E 6-BENZILAMINOPURINA NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *P. tenuifila*

Relacionando os efeitos promotores na germinação, do armazenamento em baixa temperatura e da embebição prévia das sementes de *P. tenuifila* em GA₃ é possível sugerir que nessa espécie a necessidade das sementes pela exposição a 5°C, para alcançar 73,6% de germinação, pode ser substituída pela aplicação do ácido giberélico, em que alcançaram 79,2% de germinação, padrão parecido com os das sementes de fruteiras de regiões temperadas que requerem a exposição à baixa temperatura das sementes para quebrar a dormência.

Os teores de água de sementes de *P. tenuifila*, logo após a coleta dos frutos frescos, em todos os experimentos realizados, variaram entre 11,05% e 12,73%, teores de água considerados baixos em relação às sementes de muitas espécies. Isso indica que essas sementes passaram pelo processo de dessecação durante a fase de maturação e que, portanto, produziram o ABA, que, certamente, atuou no processo de desenvolvimento e tolerância à dessecação.

O fato da germinação das sementes dos controles, não embebidas ou embebidas em água, nos diferentes experimentos terem sido variáveis (de 12% a 59,3%) sugere que talvez as outras sementes que não germinaram nesse tratamento e nos demais tratamentos do controle, tenham mecanismos de dormência ativos que estejam inibindo a germinação, uma vez que, com o ácido giberélico, a taxa de germinação chegou a quase 80%, além de tornar a germinação mais rápida do que a das sementes não embebidas ou embebidas em água.

Assim, é possível que as sementes de *P. tenuifila* utilizadas nos experimentos apresentavam níveis variados de ABA e GA, com certa porcentagem de sementes com os níveis de ABA altos, em relação ao GA e que não germinaram nos controles, sem embebição ou com embebição em água, e sementes com níveis de ABA baixos e de GA elevados, e que germinaram nos controles sem embebição ou embebição com água. Dessa forma, apenas o suprimento exógeno de GA foi funcional e fez com que a razão ABA/GA das sementes diminuísse, superando a dormência das sementes e promovendo a germinação. O

suprimento exógeno de BAP, por outro lado, não contribuiu para que isso ocorresse.

Em seu trabalho, Isutsa (2004) pré-embebeu as sementes de *P. edulis* por sete dias em solução com 0,14 μM de GA_3 para auxiliar na quebra da dormência e germinação.

Dentre os 11 tratamentos testados por Delanoy *et al.* (2006) para três espécies de maracujás bolivianos, três incluíam a embebição em água [24 h, 48 h ou 5 minutos em água quente (60°C)] e três envolviam a utilização de GA_3 . Os outros tratamentos destinavam-se a remoção do ponto basal ou apical da semente ou a escarificação. Porém, cada espécie teve uma resposta diferente aos tratamentos. Para *P. mollissima*, os melhores tratamentos foram a remoção do ponto basal da semente ou esse tratamento em conjunto com a embebição das sementes, por 48 horas em solução de 50 ppm de GA_3 (18% de germinação); para uma espécie nova, ainda não descrita quando o trabalho foi publicado, os melhores tratamentos foram 24 h de embebição em 400 ppm de GA_3 (42% de germinação) ou a remoção do ponto basal da semente associada à embebição em 50 ppm de GA_3 (36% de germinação), e; para *P. tricuspis*, apenas a remoção do ponto apical das sementes (57% de germinação). Esses autores concluíram que as três espécies estudadas apresentavam dormência exógena, provavelmente devido à dormência mecânica (imposta pelos tecidos externos da semente, que restringem o crescimento da radícula) e à dormência química (presença de inibidores nos tecidos que revestem externamente a semente). Apenas *P. mollissima* apresentou dormência física, devido à impermeabilidade do tegumento.

Os valores máximos de germinação obtidos por esses autores nos tratamentos com GA_3 foram inferiores aos obtidos no presente trabalho para *P. tenuifila*, mas é necessário salientar que a concentração de GA_3 utilizada foi muito maior, de 2,5% (equivalente a 25.000 ppm) e ainda o período de embebição foi por 5 dias. Além disso, no caso das sementes de *P. tenuifila*, não houve necessidade de remoção de qualquer ponto da semente, o que representa uma vantagem do protocolo aqui descrito.

Sharma, Sharma e Sharma (2014), aplicando pré-tratamentos com GA (embebição por 24 h em solução com 1 mM de GA_3 , e germinação das sementes em papel filtro umedecido com GA_3) e baixas temperaturas (4°C por 30 dias), evidenciaram a dormência em sementes de *Saussurea costus* (Asteraceae), pois as maiores taxas de germinação com as sementes frescas se deram com as sementes pré-tratadas. Após 12 e 18 meses de armazenamento, as sementes pré-tratadas não diferiram significativamente do controle. Por conseguinte, estes pré-

tratamentos suprimiram a necessidade de armazenamento das sementes e auxiliaram na quebra da dormência. Estes experimentos indicam que o tempo de embebição e o melhor método para a quebra de dormência parecem ser espécie-específicos. Além disso, estes dados foram congruentes com os resultados obtidos com *P. tenuifila*, uma vez que o GA apresentou a maior taxa de germinação das sementes quando comparado aos outros tratamentos.

Marques (2009) demonstrou que a ação conjunta de um ou dois tipos de GA com uma citocinina em baixas concentrações (até 100 mg.L⁻¹) culminou com o aumento da taxa de germinação comparado com o tratamento de embebição em água para *P. setacea*, efeito semelhante ao obtido para sementes de *P. tenuifila*, contudo, no trabalho de Marques, as sementes foram colocadas para germinar sobre papel umedecido com soluções dos fitorreguladores, o que talvez justifique a utilização de uma concentração mais baixa do que as utilizadas na embebição de sementes de *P. tenuifila*.

As giberelinas são produzidas pelo eixo embrionário e vão estimular o metabolismo de degradação das reservas das sementes, que vão nutrir e sustentar o desenvolvimento do eixo embrionário. O ABA inibe a síntese das enzimas hidrolíticas induzidas pelo GA, inibindo a transcrição do mRNA da alfa-amilase, impedindo a germinação. O ABA pode agir ativando a expressão do gene que codifica a proteína VP1, que age como repressor da transcrição de alguns genes regulados pelo GA ou pode reprimir a expressão do gene GAMYB (induzida pelo GA), que está envolvido na expressão da alfa-amilase, necessária para a degradação do amido (TAIZ; ZEIGER, 2009). Talvez as sementes de *P. tenuifila* tenham uma alta quantidade de ABA que esteja bloqueando a ação das giberelinas ou quantidade insuficiente de giberelinas, para desencadear a mobilização das reservas da semente e a germinação, sendo necessário o aporte adicional exógeno, para que esse processo ocorra, e que, no caso das sementes mantidas a 5°C, a baixa temperatura tenha, por si só, agido no sentido de estimular a biossíntese do GA, diminuindo a razão ABA/GA necessária para promover a germinação das sementes.

O fato do tratamento de pré-embebição em GA₃ ter promovido a germinação das sementes de *P. tenuifila* sugere a presença de dormência química, já que, segundo Bewley e Black [1994 *apud* DELANOY *et al.* (2006)], a aplicação de ácido giberélico libera a semente da dormência causada por inibidores. Esses inibidores poderiam estar localizados nos tecidos externos de revestimento da semente (dormência exógena química) e/ou no embrião (dormência endógena fisiológica).

5.3. EFEITO DO ARMAZENAMENTO DOS FRUTOS AO AR LIVRE A 25°C NA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *P. TENUIFILA*

Assim como o teor de água dos frutos, as sementes também tiveram uma redução em seus teores de água com o decorrer do tempo de armazenamento dos frutos ao ar livre, a 25°C e, segundo Bryant (1989), a desidratação das sementes é influenciada pelas condições ambientais, nomeadamente a umidade relativa do ar atmosférico.

Os baixos teores de água das sementes dos frutos de *P. tenuifila* expostos à dessecação ao ar livre (abaixo de 10%) contribuíram para a manutenção da viabilidade a 25°C, uma vez que poderiam atuar, restringindo ao mínimo, o metabolismo respiratório das sementes e evitar a deterioração, impedindo a degradação das reservas, pela manutenção continuada do metabolismo respiratório (glicólise, ciclo de Krebs) e via das pentoses fosfato, que deve ocorrer em sementes com níveis maiores de hidratação. A dessecação das sementes poderia, também, atuar no sentido de diminuir a degradação das reservas, pela restrição da incidência de fungos e bactérias.

A dessecação simultânea dos frutos pode ter contribuído para minimizar a incidência de fungos e bactérias e para evitar a oxidação dos compostos de reserva das sementes, pois o ambiente interno do fruto dessecado protegeria as sementes da exposição ao oxigênio da atmosfera, além de ser um ambiente estéril, que protegeria as sementes da degradação decorrente da incidência de microrganismos. Uma comprovação de que o interior dos frutos é um ambiente livre de microrganismos ocorreu nos experimentos de cultura *in vitro* dos endocarpos, em que os frutos desinfectados externamente foram abertos no fluxo laminar e os endocarpos removidos e inoculados no meio de cultura, sem que ocorresse qualquer contaminação.

Dessa forma, esses fatos poderiam explicar a eficiência da manutenção da viabilidade das sementes, por períodos tão longos, quando a dessecação foi associada à manutenção das mesmas dentro dos frutos dessecados. É importante notar que essas condições foram necessárias para manter a viabilidade das sementes, mas não foi possível realizar experimentos em que as sementes fossem embebidas em água e colocadas para germinar, para demonstrar se ainda estavam em dormência.

De acordo com Santagapita *et al.* (2014) a conservação de biomoléculas funcionais e estruturais, lábeis, em sistemas biológicos, farmacêutico e na área de ciências dos alimentos geralmente é garantida através de sistemas desidratados ou congelados. O germoplasma vegetal é conservado, normalmente, através de sementes, que são sistemas

naturalmente desidratados. As sementes ortodoxas, as mais comuns, toleram a desidratação a teores de água muito baixos e podem permanecer viáveis por vários anos.

A dessecação natural das sementes de *P. tenuifila* nos frutos intactos beneficiou a manutenção da viabilidade, pois, segundo Lang *et al.* (2014), em sementes ortodoxas, por exemplo, vários processos ou mecanismos protetores podem ser acionados nas sementes, durante o processo de desenvolvimento de tolerância à desidratação, como o acúmulo de oligossacarídeos, a síntese e armazenamento de proteínas como as LEA e proteínas tolerantes a altas temperaturas, a presença de sistemas antioxidantes, como a glutatona e de enzimas antioxidantes. Esses mecanismos impedem, por exemplo, que as moléculas importantes do metabolismo da germinação sofram alterações na sua conformação e percam a sua atividade, tornando as sementes inviáveis.

Quando esses mecanismos não estão presentes nas sementes, uma das estratégias, para melhorar estabilidade das moléculas, sob dessecação, é embebição em solutos osmo-protetores, como a trealose. Esses solutos promovem interações específicas, especialmente as pontes de hidrogênio, com estruturas biológicas estabilizando-as durante a dessecação. Várias biomoléculas, como proteínas e estruturas, como membranas, células, sementes e microrganismos tem sido estabilizados, tornando-se tolerantes à dessecação, via imobilização em matrizes de açúcares, em estado vítreo (intermediário entre os estados líquido e sólido), obtidos por congelamento. A trealose, por exemplo, um dissacarídeo não redutor, tem um efeito protetor sobre as biomoléculas, que é explicado não só pela capacidade de formar a matriz em estado vítreo, mas também pela interação intermolecular com as biomoléculas, através de pontes de hidrogênio. Esses procedimentos, porém tornam os protocolos de conservação mais complexos e menos práticos.

Assim, o fato das sementes de *P. tenuifila*, poderem ser armazenadas em frutos dessecados ao ar livre, mantendo a viabilidade por períodos relativamente longos é um método simples e eficiente, que pode ser empregado na conservação de germoplasma, desde que sejam monitorados e mantidos os níveis adequados de umidade relativa do ar, ao redor de 70%.

5.4. EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NA GERMINÇÃO DAS SEMENTES DE *P. TENUIFILA*

A sobrevivência das sementes de *P. tenuifila* ao nitrogênio líquido foi devido aos teores de água abaixo de 10%, observado após 12 meses de armazenamento em frutos que dessecaram ao ar livre a 25°C.

Avaliando o efeito do teor de água das sementes de duas espécies de *Passiflora* sobre a viabilidade das mesmas expostas à criopreservação, Ospina *et al.* (2000) observaram que as sementes com o teor de água menor que 12% toleravam a exposição ao nitrogênio líquido. A criopreservação foi letal para as sementes com mais de 14% de teor de água. Contudo, a viabilidade caiu de 95%, nas sementes com mais de 14% de teor de água, as quais foram deixadas por 8h secando ao ar livre, para menos de 80%, nas sementes deixadas secando por mais de dois dias, as quais reduziram o conteúdo de umidade para menos de 8%. A queda na viabilidade pode ter sido devido aos métodos de secagem aos quais as sementes foram submetidas, uma vez que tiveram o arilo removido e deixadas secando por 8h ou 5 dias em temperatura ambiente [22°C com 40-50% de umidade relativa (UR)], ou 5 dias em sala com reduzida UR (22°C e 20-30% UR) ou 2 dias em sílica gel (22°C e 5-13% UR). Caso as sementes fossem deixadas secando dentro dos frutos intactos, assim como descrito em 3.2.3, talvez a viabilidade não fosse tão afetada.

Tanto Ospina *et al.* (2000) como González-Benito, Aguilar e Ávila (2009), ao induzirem as sementes à dessecação, colocando-as, sem o arilo, em sílica gel por dois dias, obtiveram valores de teor de água abaixo do obtido neste trabalho com a desidratação natural. Enquanto os autores conseguiram valores abaixo de 5% no teor de água, chegando a 2,6% para *P. edulis*, (OSPINA *et al.*, 2000), o mínimo obtido neste trabalho foi de 8%. Entretanto, González-Benito, Aguilar e Ávila (2009) salientam que o nível de hidratação ótimo para permitir a criopreservação é uma estreita faixa, no qual altos valores levariam a formação de cristais de gelo dentro da semente, e valores muito baixos podem levar o embrião à desidratação, ambos inviabilizando a criopreservação. Para chegar à faixa ótima, deve-se testar cada espécie individualmente, conforme conclui Meletti *et al.* (2007).

O fato das sementes de *P. tenuifila* terem sobrevivido à exposição ao nitrogênio líquido, sugere que essa forma de conservação de germoplasma, a longo prazo, pode ser utilizada para sementes dessa espécie, uma vez otimizado o protocolo de criogenia, com a realização de novos experimentos, com sementes com maior taxa de viabilidade.

5.5. EFEITO DO ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES DE *P. TENUIFILA*, ENVOLVIDAS PELO ENDOCARPO E MANTIDAS *IN VITRO* A 5°C E 25°C, NA GERMINAÇÃO

O armazenamento das sementes envolvidas pelo endocarpo e mantidas *in vitro*, tanto a 5°C como a 25°C, protegeu as sementes da

exposição aos microrganismos e da oxidação provocada pela exposição das mesmas à atmosfera, o que pode ter contribuído para a manutenção da viabilidade das sementes de *P. tenuifila*, por longos períodos.

No armazenamento *in vitro*, tanto a 5°C como a 25°C, as sementes mantiveram o nível de hidratação observado no início do experimento, de 11,44%, e os níveis de hidratação foram, portanto mantidos entre 10,14% e 13,96%, durante todos os períodos de armazenamento.

Com esse nível de umidade, se as sementes não estivessem em condição axênica, representada pela condição estéril do interior do endocarpo, e pelo ambiente da cultura *in vitro*, certamente a incidência de microrganismos seria muito alta, contribuindo para que ocorresse a degradação das reservas das sementes e a perda da viabilidade.

A perda da viabilidade, após 4 meses de armazenamento a 25°C, sugere que a partir desse período de armazenamento, como as sementes estavam hidratadas é possível que a manutenção da atividade das enzimas do metabolismo da respiração e de outras rotas metabólicas tenha contribuído para degradar as reservas das sementes e torná-las inviáveis. A 5°C esse processo foi minimizado, explicando a manutenção da viabilidade por períodos de até 18 meses de armazenamento.

A única condição de armazenamento a 25°C em que as sementes permaneceram viáveis foi dentro dos frutos dessecados, com as sementes com teores de umidade muito mais baixos, entre 8,38 e 9,42%, indicando que o baixo teor de umidade contribuiu para que mantivessem a viabilidade.

Como nesses experimentos não foram realizados tratamentos de embebição das sementes em água e de não embebição, no decorrer de todos os tempos de armazenamento, não é possível saber se o armazenamento dos endocarpos *in vitro* a 5°C quebrou a dormência das sementes. O único experimento em que foi possível a embebição das sementes armazenadas nos endocarpos a 5°C e 25°C, em água foi o realizado com 4 meses de armazenamento, e a não germinação das sementes sugere que as mesmas continuavam em dormência, pelo menos até esse período de armazenamento.

Um fato interessante observado em ambas as temperaturas de armazenamento foi que a coloração do meio de cultura foi sendo alterada, no decorrer do tempo, tornando-se bege claro e marrom, o que sugere a exsudação de compostos dos endocarpos/sementes, talvez compostos fenólicos. Pode ser que nessas condições houvesse a lixiviação de possíveis compostos inibidores da germinação para o meio

de cultura. Experimentos complementares devem ser conduzidos, sem a embebição das sementes em ácido giberélico, para comprovar se a lixiviação desses compostos promoveria a germinação das sementes de *P. tenuifila*. Seria então possível comparar os tratamentos de armazenamento das sementes, a 5°C nos frutos e nos endocarpos *in vitro*.

O fato das sementes de *P. tenuifila* poderem ser armazenadas nos endocarpos mantidos *in vitro* a 5°C por períodos de até 18 meses, sugere que esse método de conservação pode ser utilizado, como alternativa, para a conservação de germoplasma, apesar de implicar em gastos e ser mais trabalhoso.

5.6. CULTURA *IN VITRO* DE *P. TENUIFILA*

Os resultados obtidos nos experimentos de cultura *in vitro* indicaram que, aos 3 meses de cultivo em glicose seria possível produzir de 16 a 19 novas microplantas a partir de uma única planta, quase que duplicando a taxa de multiplicação em relação à sacarose. É possível que a produção de invertases pelos explantes inoculados, enzimas que degradam a sacarose em glicose e frutose, para o metabolismo da via glicolítica tenha sido deficiente para favorecer o aproveitamento dessa fonte de carbono.

Diversos autores vêm estudando a micropropagação de Passifloras, mas a regeneração tem sido alcançada por meio da organogênese, a partir de uma grande variedade de espécies (*P. edulis*, *P. cincinnata*, *P. suberosa*, *P. caerulea*), usando várias combinações de reguladores de crescimento de plantas e vários tipos de explantes (DORNELAS; VIEIRA 1994; LOMBARDI *et al.*, 2007; BRAGLIA *et al.*, 2010; PINTO *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011).

De acordo com Faria *et al* (2007), a maioria dos trabalhos de micropropagação com espécies do gênero *Passiflora* são realizados com *P. edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa*, sendo os explantes mais utilizados os segmentos nodais e os ápices caulinares. Esta técnica representa uma alternativa para a obtenção de clones de interesse comercial.

Em sua revisão sobre micropropagação com *Passiflora* spp., Ozarowski e Thiem (2013) salientam que todos os estudos consultados utilizaram a sacarose como fonte de carbono, entretanto, os resultados deste trabalho indicam que a glicose promove mais efetivamente o crescimento e desenvolvimento das microplantas, pelo menos para *P. tenuifila*.

Os resultados obtidos por Isutsa (2004), Faria *et al.* (2007) e Ozarowski e Thiem (2013) para cada espécie, variedade ou ainda cada tipo de explante apresenta uma resposta específica em relação ao tipo de meio de cultura utilizado, de acordo com as concentrações dos componentes do meio e do tipo de fitoregulador utilizado, sendo portanto necessário o emprego de várias abordagens, técnicas e metodologias para aperfeiçoar os protocolos de cultura *in vitro* e encontrar a melhor resposta.

A técnica de cultura de tecidos vegetais é uma alternativa para a propagação das espécies de maracujás, sendo, também, uma ferramenta importante para a conservação do germoplasma vegetal. Os métodos de conservação *in vitro* de plantas baseiam-se, de maneira geral, nas técnicas empregadas para a micropropagação de plantas, contribuindo em todas as etapas para o processo de conservação de germoplasma (GUERRA; DAL VESCO, 2010). Faria *et al.* (2006), utilizando a sacarose e o sorbitol conservaram, por quatro meses microplantas de *P. gibertii*, utilizando doses entre 10 ou 20 g/L de sorbitol, na ausência da sacarose, sob crescimento lento. Entretanto, a falta de protocolos de regeneração e micropropagação eficientes, para a maioria das espécies de maracujás e a escassez de pesquisas com conservação *in vitro*, não tem permitido, ainda, o uso extensivo desta tecnologia.

Assim, o desenvolvimento de um protocolo eficiente de micropagação de *P. tenuifila* é relevante, pois permitirá não apenas a multiplicação de genótipos superiores dessa espécie, como também poderá servir de base para os experimentos de conservação *in vitro* de outras espécies de maracujás, cuja disponibilidade de informações na literatura ainda é muito restrita.

6. CONCLUSÕES

Os resultados indicaram que:

- 1- Por períodos curtos (máximo de 80 dias para *P. tenuifila* e 130 dias para *P. setacea*) os melhores protocolos de conservação de sementes a 5°C foram, para *P. tenuifila*, a manutenção das sementes nos frutos, em sacos plásticos e para *P. setacea*, a manutenção das sementes em sacos plásticos, sugerindo a existência de dormência nas sementes de ambas as espécies, que foi superada pela baixa temperatura.
- 2- A embebição prévia das sementes de *P. tenuifila*, imediatamente após a remoção dos frutos frescos, em solução de 2,5% de GA₃ por 5 dias promoveu a germinação em relação aos tratamentos com BAP ou GA+BAP, sugerindo a existência de dormência devido à presença de inibidores no tegumento (dormência química) e/ou no embrião (dormência fisiológica), que foi superada pela aplicação de GA.
- 3- Por períodos longos os melhores protocolos de conservação de sementes de *P. tenuifila* foram o armazenamento nos frutos, ao ar livre a 25°C (até, pelo menos, 13 meses) e o armazenamento das sementes envolvidas pelo endocarpos e mantidas *in vitro* (até pelo menos 18 meses), desde que mantidas em baixa temperatura (5°C).
- 4- As sementes de *P. tenuifila* toleraram a criopreservação, porém estudos subsequentes devem aprofundar o conhecimento acerca dos conteúdos de água ideais para tolerar a criopreservação.
- 5- O melhor tempo de desinfecção das sementes de *P. tenuifila*, que propiciou a máxima germinação *in vitro* foi de 20 minutos, apesar de retardar a velocidade de germinação.
- 6- A glicose promoveu significativamente o crescimento das microplantas de *P. tenuifila* e a taxa de multiplicação em relação à sacarose, otimizando a multiplicação clonal para a produção de mudas de *P. tenuifila* em larga escala.
- 7- A disponibilidade de protocolos de germinação *in vitro* e cultura *in vitro* permitirão a adoção de abordagens biotecnológicas de conservação *in vitro* de germoplasma de *P. tenuifila*.

REFERÊNCIAS

- ABREU, P.P.; SOUZA, M.M.; SANTOS, E.A.; PIRES, M.V.; PIRES, M.M.; ALMEIDA, A.F. de. Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**, v. 166, n. 3, p. 307-315, 12 nov. 2008.
- ALVES, C.Z.; SÁ, M.E. de; CORRÊA, L.S.; BINOTTI, F.F.S. Efeito da temperatura de armazenamento e de fitorreguladores na germinação de sementes de maracujá doce e desenvolvimento inicial de mudas. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 28, n. 3, p. 441-448, jul/set. 2006.
- AMARO, A.C.E; ZUCARELI, V; MISCHAN, M.M.; FERREIRA, G. Combinações entre ga_{4+7} + n-(fenilmetil)-aminopurina e ethephon na germinação de sementes de *Passiflora cincinnata* mast. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p.195-202, 2009.
- ARAÚJO, E.C. de; SILVA, R.F. da; VIANA, A.P.; SILVA, M.V. da. Estádio de maturação e qualidade de sementes após repouso de frutos de maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 67-76, 2007.
- BERNACCI, L.C. (Coord.) Passifloraceae. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; MELHEM, T.S.; GIULIETTI, A.M.; MARTINS, S.E. (Coords.) **Flora fanerógama do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, São Paulo, SP, v.3, p. 247-274. 2003.
- BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; NUNES, T.S.; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. *Passiflora*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2016. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12506> Acesso em: março de 2016.
- BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; PASSOS, I.R.S.; JUNQUEIRA, N.T.V. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V., BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 559-586. 2005.
- BEWLEY, J.D., BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York, NY: Plenum Press, 1994.

BRAGA, M.F.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SANTOS, E.C.; SOUZA, A.A.T.C.; REZENDE, L.N.; FALEIRO, F.G.; VAZ, C.F. **Enxertia, no campo, de passifloras silvestres**. Folder. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006.

BRAGLIA, L.; BENEDETTI, L. de; GIOVANNINI, A.; NICOLETTI, F.; BIANCHINI, C.; PIPINO, L.; MERCURI, A. *In vitro* plant regeneration as a tool to improve ornamental characters in *Passiflora* species. **Acta Horticulturae**, v. 855, p. 47–52, 2010.

BRYANT, J.A. **Fisiologia da semente**. São Paulo, SP: EPU, 86 p. 1989.

CAMPOS, A.V.S. **Características físico-químicas e composição mineral da polpa de *Passiflora setacea***. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de Brasília, Brasília, DF. 90p. 2010.

CARDONA, C.E.; ARAMENDIZ, H.; ROBLES, J.; LÓPEZ, V.; UBARNES, J. Efecto de diferentes ambientes y empaques sobre la viabilidad de semillas de maracujá (*Passiflora edulis* var. *Flavicarpa Degener*). **Temas Agrarios**, v. 10, n. 2, p. 15-25, 7 jan. 2005.

CERVI, A.C. Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontquerian**. 45, p. 1-92. 1997.

COSTA, A.M.; TUPINAMBÁ, D.D. O maracujá e suas propriedades medicinais: o estado da arte. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V., BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 475-506. 2005.

COSTA, C.J.; SIMÕES, C. de O.; COSTA, A.M. Escarificação mecânica e reguladores vegetais para superação da dormência de sementes de *Passiflora setacea* D.C. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 271, 15 p. 2010.

CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L.V.; JUNQUEIRA, N.T.V. Espécies de maracujazeiro. In: LIMA, A.A. (Ed.). **Maracujá – produção: aspectos técnicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 104 p. 2002.

DELANOY, M.; VAN DAMME, P.; SCHELDEMAN, X.; BELTRAN, J. Germination of *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey, *Passiflora*

tricuspis Mast. and *Passiflora* nov sp. seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 2, p. 198–203, 9 out. 2006.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1–23, set. 2004.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Tissue culture on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 36, n. 2, p. 211–217, fev. 1994.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. **Handbook of Seed Technology for Genebanks**. Volume II. Compendium of Specific Germination Information and Test Recommendations. Roma: International Board for Plant Genetic Resources, 456 p. 1985

EMBRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Rede Passitec**. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/passitec/> Acesso em: maio de 2016.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; COSTA, A.M. **Conservação e caracterização de espécies silvestres de maracujazeiro (*Passiflora* spp) e utilização potencial no melhoramento genético, como porta-enxertos, alimentos funcionais, plantas ornamentais e medicinais: resultados de pesquisa**. Planaltina, DF. Embrapa Cerrados, 34 p. 2012. Disponível em: http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/versaomodelo/html/2012/doc/doc_312.shtml Acesso em: abril de 2016.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; OLIVEIRA, E.J. de; PEIXOTO, J.R.; COSTA, A.M. **Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro: histórico e perspectivas**. Planaltina, DF. Embrapa Cerrados, 36 p. 2011.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; FÁVERO, A.P.; LOPES, M.A. Pré-melhoramento de plantas: experiências de sucesso. In: FALEIRO, F.G.; FARIAS NETO, A.L.; RIBEIRO JR., W.Q. (Orgs). **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p 45-62. 2008.

Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/562158> Acesso em: maio de 2016

- FARIA, G.A; COSTA, M.A.P. de C.; JUNGHANS, T.G; LEDO, C.A. de S; SOUZA, A. de S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.
- FARIA, G.A.; COSTA, M.A.P. de C.; LEDO, C.A. de S.; JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A. da S.; CUNHA, M.A.P. da. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, v. 66, n. 4, p. 535-543, 2007.
- FERRARI, T. B.; FERREIRA, G.; MISCHAN, M.M.; PINHO, S.Z. de. Germinação de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis): fases e efeito de reguladores vegetais. **Biotemas**, v. 21, n. 3, p. 65–74, 1 jan. 2008.
- FERREIRA, F.R. Recursos genéticos de *Passiflora*. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V., BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 41-51. 2005.
- FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J.M. Passifloraceae. In: KUBITZKI, K. (Ed), **The families and genera of vascular plants**, Vol. 9. Springer Verlag, Berlin, p. 270–281. 2007.
- FINKELSTEIN, R.R. The role of hormones during seed development and germination. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant Hormones**. [s.l.] Springer Netherlands, p. 549–573. 2010.
- GARCIA, R.; PACHECO, G.; FALCAO, E.; BORGES, G.; MANSUR, E. Influence of type of explant, plant growth regeneration, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, n. 1, p. 47–54, jul. 2011.
- GONZÁLEZ-BENITO, M.E. Cryopreservation as a tool for preserving genetic variability: its use with Spanish wild species with possible landscaping value. **Acta Horticulturae**, v. 457, n. 1, p. 133-142, 1 jul. 1998.
- GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; AGUILAR, N.; ÁVILA, T. Germination and embryo rescue from *Passiflora* species seeds post-cryopreservation. **Cryoletters**, v. 30, n. 2, p. 142–147, 1 mar. 2009.

GRAEBER, K.; NAKABAYASHI, K.; MIATTON, E.; LEUBNER-METZGER, G.; SOPPE, W.J.J. Molecular mechanisms of seed dormancy. **Plant, Cell & Environment**, v. 35, n. 10, p. 1769–1786, 1 out. 2012.

GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L. Strategies for the micropropagation of bromeliads. *In*: JAIN, S.M.; OCHATT, S.J. (eds.). **Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants: methods in molecular biology**. New York: Humana Press-Springer. v. 589, p. 47-66, 2010.

HERMANN, K.; MEINHARD, J.; DOBREV, P.; LINKIES, A.; PESEK, B.; HEß, B.; MACHÁČKOVÁ, I.; FISCHER, U.; LEUBNER-METZGER, G. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid during the germination of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): a comparative study of fruits and seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 11, p. 3047–3060, 1 ago. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes**. Rio de Janeiro, RJ, v. 41, 100 p. 2014. Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2014_v41-br.pdf Acesso em: junho de 2016.

ISUTSA, D.K. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae**, v. 99, n. 3–4, p. 395–400, 27 fev. 2004.

JUNGHANS, T.G.; VIANA, A.J.C.; JUNGHANS, D.T. Remoção parcial do tegumento na germinação *in vitro* e *ex vitro* de sementes de *Passiflora gibertii* N.E. Brown. **Magistra**, v. 20, n. 3, p. 231-235, jul./set. 2008.

JUNQUEIRA, N.T.V.; ANJOS, J.R.N. dos; SILVA, A.P.O.; CHAVES, R.C.; GOMES, A.C. Reação às doenças e produtividade de onze cultivares de maracujá-azedo cultivadas sem agrotóxico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 1005-1010, 1 ago. 2003.

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. *In*: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V., BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e**

melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 81-108. 2005.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 2ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 431 p. 2008.

KILLIP, E. **The American species of Passifloraceae**. Botanical Series. Field Museum of Natural History v. 19, 613 p. 1938. Disponível em: <http://www.biodiversitylibrary.org/item/19789> Acesso em maio de 2016.

LANG, S.; LIU, X.; MA, G.; LAN, Q.; WANG, X. Identification of desiccation tolerance transcripts potentially involved in rape (*Brassica napus* L.) seeds development and germination. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 83, p. 316-326. 2014.

LOMBARDI, S.P.; PASSOS, I.R.S.; NOGUEIRA, M.C.S.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B. *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 2, p. 239-247, mar. 2007.

MARQUES, D.S. **Germinação de sementes de *Passiflora setacea* DC.**: temperatura, luz e reguladores vegetais. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 89 p. 2009.

MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 4th ed. Oxford: Pergamon Press, 270 p. 1989.

MELETTI, L.M.M.; BARBOSA, W.; VEIGA, R.F.A. Criopreservação de sementes de três espécies de maracujazeiro. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18, Florianópolis, SC. **Anais...** 2004.

MELETTI, L.M.M.; BARBOSA, W.; VEIGA, R.F.A.; PIO, R. Criopreservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 6, n. 1/2, p. 13-20, 2007.

MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R.S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. *In*: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V., BRAGA, M.F.

Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 55-78. 2005.

MIRANDA, D.; PEREA, M.; MAGNITSKIY, S. Propagación de especies de pasifloráceas. In: MIRANDA, D. *et al.* (Eds.). **Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia:** maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. Bogotá: Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, p. 69-96. 2009.

MIRANSARI, M.; SMITH, D.L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v. 99, p. 110–121, mar. 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15., p. 473-497, 1962.

NOGUEIRA FILHO, G.C.; RONCATTO, G.; RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J.C. de; MALHEIROS, E.B. Produção de mudas de maracujazeiro-amarelo por enxertia hipocotiledonar sobre sete espécies de passifloras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 237–245, mar. 2011.

OLIVEIRA JÚNIOR, M.X. de; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; MORAIS, O.M.; DOURADO, F.W.N. Superação de dormência de maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata* Mast.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 584-590, jun. 2010.

OSPINA, J.A.; GUEVARA, C.L.; CAICEDO, L.E.; BARNEY, V. Effects of moisture content on *Passiflora* seed viability after immersion in liquid nitrogen. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, F. (Eds.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm:** current research progress and application. JIRCAS International Agriculture Series, v. 8, p. 378-381. 2000.

OZAROWSKI, M.; THIEM, B. Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 6, p. 937–947, nov. 2013.

PÁDUA, J.G.; SCHWINGEL, L.C.; MUNDIM, R.C.; SALOMÃO, A.N.; ROVERIJOSÉ, S.C.B. Germinação de sementes de *Passiflora*

setacea e dormência induzida pelo armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 1, p. 80-85, 2011.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V., BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 457-463. 2005.

PEREIRA, W.V.S.; VIEIRA, L.M.; OLIVEIRA, T.G.S.; AQUINO, F.F.; RIBEIRO, L.M.; MERCADANTE-SIMÕES, M.O. Efeito de métodos de armazenamento sobre a germinação de sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. In: **IX Simpósio Nacional Cerrado**. Brasília, DF. Anais... 2008. Disponível em: http://www.cpac.embrapa.br/publicacoes/publ_index.html Acesso em Julho de 2014

PEREIRA, W.V.S.; VIEIRA, L.M.; RIBEIRO, L.M.; MERCADANTE-SIMÕES, M.O.; OLIVEIRA, T.G.S. Armazenamento de sementes de maracujazeiros. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 2, p. 273-278, abr./jun. 2011.

PINTO, D.L.P.; ALMEIDA, A.M.R. de; RÊGO, M.M.; SILVA, M.L. da; OLIVEIRA, E.J. de; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, n. 3, p. 521-530, dez. 2011.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 8ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan. 856 p. 2014.

RONCATTO, G.; OLIVEIRA, J.C. de; RUGGIERO, C.; NOGUEIRA FILHO, G.C.; CENTURION, M.A.P.C.; FERREIRA, F.R. Comportamento de maracujazeiros (*Passiflora* spp.) quanto à morte prematura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 552–554, dez. 2004.

SANTAGAPITA, P.R.; SCHNEIDER, H.O.; AGUDELO-LAVERDE, L.M.; BUERA, M.P. Impact of protective agents and drying methods on desiccation tolerance of *Salix nigra* L. seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 82, p. 262-269. 2014.

SANTOS, C.H.B.; CRUZ NETO, A.J. da; JUNGHANS, T.G.; JESUS, O.N. de; GIRARDI, E.A. Estádio de maturação de frutos e influência de ácido giberélico na emergência e crescimento *Passiflora* spp. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 3, p. 481–490, set. 2016.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, Número Especial, p. 70-84, 2000.

SILVA, C.V.; OLIVEIRA, L.S.; LORIATO, V.A.P.; SILVA, L.C.; CAMPOS, J.M.S.; VICCINI, L.F.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passion fruit species, *P. cincinnata* Masters. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 107, n. 3, p. 407-416, dez. 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ª ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 819 p. 2009

TUPINAMBÁ, D.D.; COSTA, A.M.; COHEN, K. de O.; PAES, N.S.; FALEIRO, F.G.; CAMPOS, A.V.S.; SANTOS, A.L. de B.; SILVA, K.N. da; JUNQUEIRA, N.T.V. Pulp yield and mineral content of commercial hybrids of yellow passion fruits. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 15–20, mar. 2012.

VEIGA-BARBOSA, L.; MIRA, S.; GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; SOUZA, M.M.; MELETTI, L.M.M.; PÉREZ-GARCÍA, F. Seed germination, desiccation tolerance and cryopreservation of *Passiflora* species. **Seed Science and Technology**, v. 41, p. 89-97, abr. 2013.

WELTER, M.K; SMIDERLE, O.J; UCHÔA, S.C.P; CHANG, M.T; MENDES, E.P. Germinação de sementes de maracujá amarelo azedo em função de tratamentos térmicos. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 5, n. 3, p. 227-232, 2011.

ZERAIK, M.L.; PEREIRA, C.A.M.; ZUIN, V.G.; YARIWAKE, J.H. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 459–471, jul. 2010.

ZUCARELI, V; FERREIRA, G; AMARO, A.C.E; ARAÚJO, P. Fotoperíodo, temperatura e reguladores vegetais na germinação de

sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 3, p. 106-114, 2009a.

ZUCARELI, V.; FERREIRA, G.; AMARO, A.C.E.; FAZIO, J.L. de. GA₄₊₇ + N-(fenilmetil)-aminopurina na germinação de sementes e emergência de plântulas de *Passiflora cincinnata* Mast. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 216–223, mar. 2009b.

ZUCOLOTTO, S.M.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F.H.; RAMOS, F.A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E.P. Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 3, p. 232–239, 1 maio 2012.

APÊNDICE - Fotografias

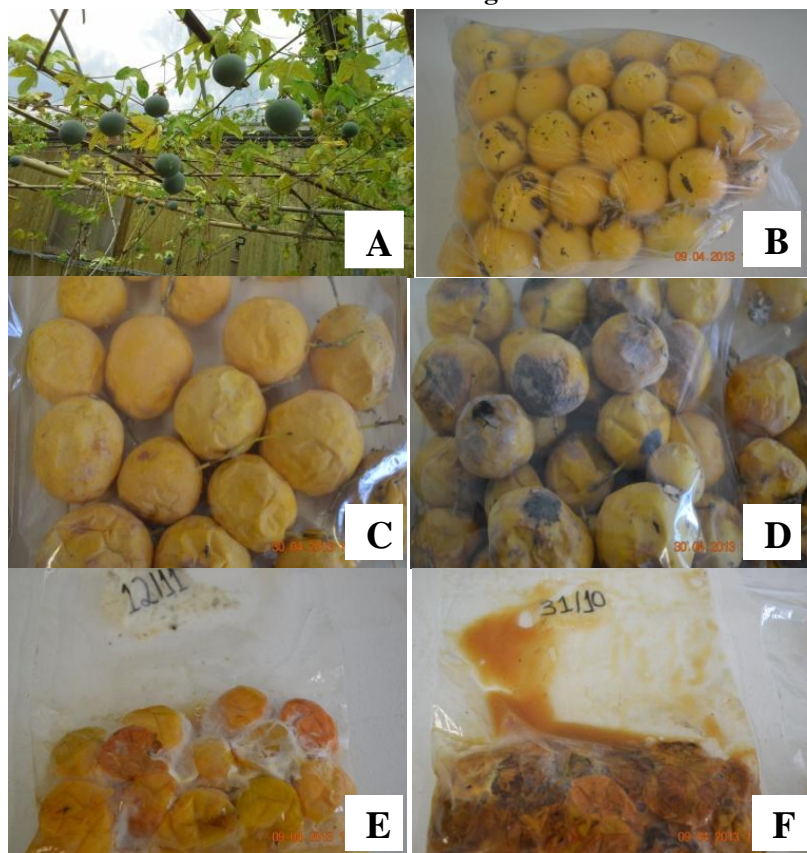


Figura 1. Frutos frescos de *Passiflora tenuiflora*, na planta (A); frutos maduros recém-coletados em sacos plásticos (B); frutos embalados para o armazenamento a 5°C (C); frutos em estágios progressivos de deterioração no armazenamento a 5°C (D, E, F), culminando com a polpa em estado liquefeito (E, F).

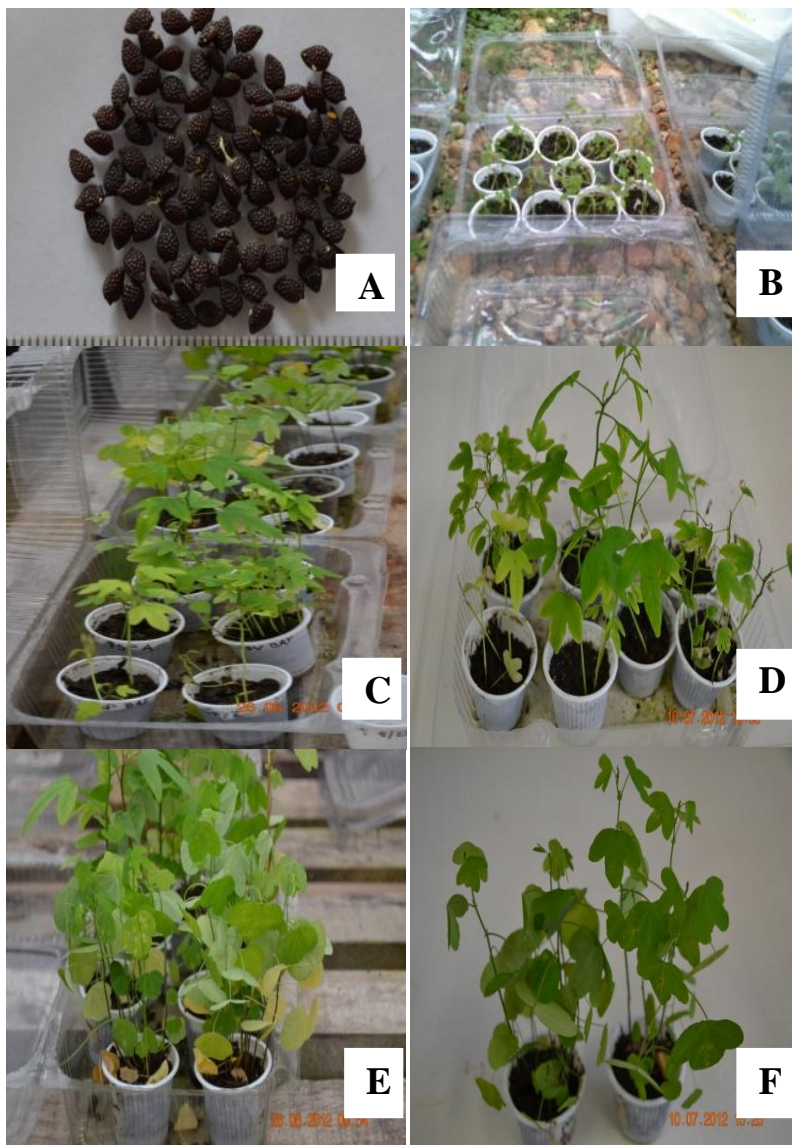


Figura 2. Sementes de *Passiflora tenuifila*, sem arilo, escala milimetrada (A); plântulas oriundas da germinação, em casa de vegetação (B); plântulas de *P. setacea* oriundas de sementes pré-embebidas com reguladores de crescimento (C,D); plântulas de *P. tenuifila* oriundas de sementes pré-embebidas com reguladores de crescimento (E,F).

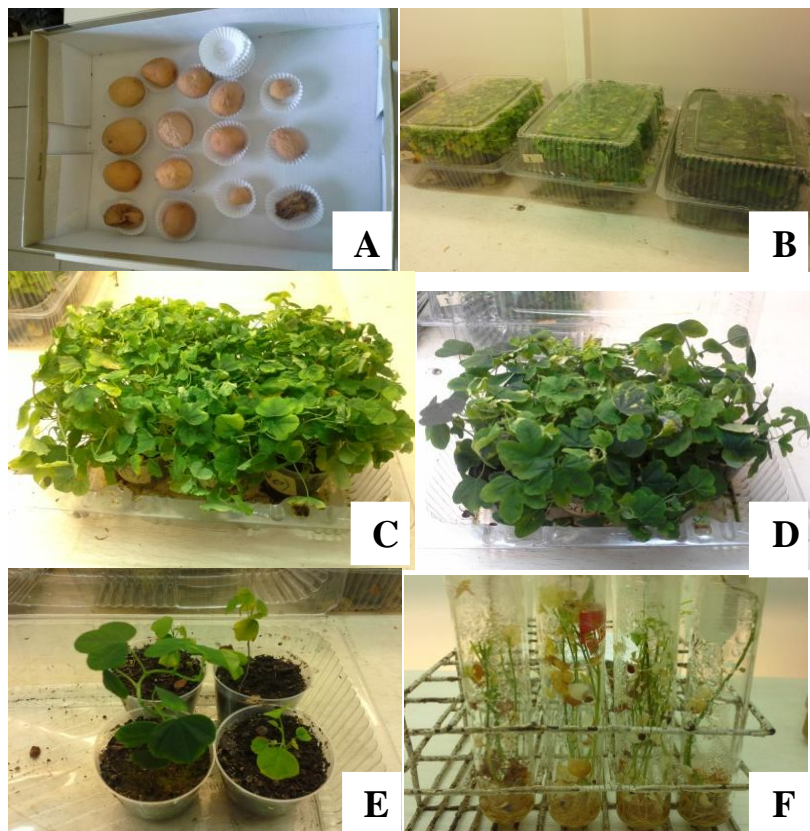


Figura 3. Frutos de *Passiflora tenuiflora*, desidratados ao ar livre a 25°C, em caixa de papelão (A); plântulas oriundas da germinação, em condições controladas, de sementes de frutos desidratados (B, C, D); plântulas oriundas de sementes criopreservadas (E, esquerda) e não criopreservadas (E, direita); plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro* (F).